



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



APLICACIÓN DE ADULTICIDAS PARA EL CONTROL DE *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894).

Memoria presentada por:

Mikel Bengoa Paulis

Para optar al grado de Doctor en Veterinaria

Dirigida por los Doctores:

D. Javier Lucientes Curdi

D. Roger Eritja Mathieu

Zaragoza, Febrero 2018



**Universidad
Zaragoza**



**Consell Comarcal
del Baix Llobregat**

Dr. JAVIER LUCIENTES CURDI, Catedrático del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y Dr. ROGER ERITJA MATHIEU, Co-director del Servei de Control de Mosquits del Consell Comarcal del Baix Llobregat,

CERTIFICAN:

Que D. MIKEL BENGUA PAULIS ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “Aplicación de adulticidas para el control de *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894)” que se ajusta con el Proyecto de Tesis presentado y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizan su presentación como compendio de publicaciones para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente certificado.

En Zaragoza, a 19 de Febrero de 2018.

Dr. J. Lucientes

Dr. R. Eritja

Agradecimientos

Muchos son los que me han apoyado y animado durante el camino que he recorrido para llegar a escribir esta Tesis. Pocas veces se tiene la oportunidad de dejar por escrito un agradecimiento, por lo que espero aprovechar bien este espacio. Perdonar de antemano si no aparecéis en este capítulo.

Primeramente agradecer a mis dos directores de tesis todo el apoyo que me han demostrado, y la paciencia que han tenido conmigo. He aprendido muchas cosas a su lado, pero sobre todo he aprendido a tener una visión más crítica. No imaginaba que cuando le pedí a Javier Lucientes y a Roger Eritja que fuesen mis directores de tesis al final significase tanto trabajo por su parte! Pero tampoco imaginaba que acabase considerándolos dos buenos amigos. Con el permiso de Javier, tengo que agradecer especialmente a Roger todas las intensas y profundas revisiones, y los reducidos márgenes de tiempo de auténtico alivio entre envío de versiones y devolución de correcciones. Sin su constante supervisión soy consciente que esta tesis no habría salido adelante. Ha sido un auténtico lujo haber tenido a estos directores de tesis.

También tengo que agradecer a los entomólogos que me han ido ayudando por el camino, como Miguel Ángel Miranda, Carlos Aranda o Paco Collantes. Mención especial para Sarah Delacour, que siempre me ha animado, ofreciéndome su ayuda desinteresada en infinidad de ocasiones, superando juntos dificultades administrativas y nervios en las presentaciones orales. Sin lugar a dudas será el futuro de la entomología medico-veterinaria de España. Agradezco también en este apartado al equipo del Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza (Pedro, Nacho, Adriana, Paz, Ana y Josemi), al equipo del Laboratorio de Zoología de la Universidad de las Islas Baleares (Carlos, David, Ricardo, Claudia y Mar) y al equipo del Servei de Control de Mosquits del Baix Llobregat (Roser, Tony, y un largo etcétera). A Nacho de Blas, por su ayuda con algunos aspectos de la estadística y a Rodrigo Jerez Ebensperger por su visión del mundo a lo grande y sin complejos.

Pero esta tesis es únicamente la punta de un iceberg. Para llegar hasta aquí he tenido que crecer mucho como persona, abriendo los ojos con interés al mundo que me rodeaba. Y desde que abrí los ojos, incluso antes, mis padres Eduardo y M^a Pilar han estado ahí para cogerme de la mano y responder a mis preguntas. Gracias a los dos por haber confiado siempre en mí, aunque a veces yo tirase la toalla. Gracias por dejar que siguiese mi camino. Gracias por todo el amor que me habéis transmitido, con el cual he podido querer a otras personas. Y gracias por los hermanos que me habéis dado, Edu, Cris, Jon y David, cada uno diferente pero todos con el mismo gran corazón que vosotros. Y gracias a mi madre por los últimos meses de tu vida en los que sin apenas poder decir nada nos enseñaste a todos la grandeza de la vida, a AMAR con mayúsculas. Todos los días te siento cerca de mí. Cómo no agradecer también a mi abuela Juan Pedro, el poeta, el peluquero, el de la sonrisa perpetua. Llegó a vivir 102 años en los que se esforzó en hacer la vida mejor a los demás, dándome muchas lecciones de vida.

No me voy a olvidar de otras personas que han sido importantes para mi educación, científica y moral, como mi tía Loli, la cual me enseñaba lenguas clásicas mientras recorríamos las calles de San Sebastián. Tampoco me puedo olvidar del marianista Chema Garagorri, mi profesor de ciencias naturales de BUP en el colegio Aldapeta de San Sebastián, puesto que fue la primera persona que me animó a hacer la carrera de biología. También quiero agradecer a un profesor de este colegio, del cual olvidé su nombre, por haberle dicho a mi padre en una tutoría, que me olvidase de los insectos, que con eso no llegaría a ningún sitio. Hay veces que las piedras en el camino lo único que consiguen es hacerte más fuerte. Otra persona que ha marcado mucho mi vocación por la naturaleza fueron Enrique y Amalia, amigos de mis padres, que me transmitieron su amor por los animales en las fincas que tenían por Cataluña. Y cómo dejar fuera de estos agradecimientos a mi cuadrilla! Con ellos (Javi, Xabi, Sergio, Vallejo, Xabinho, Dani, Dani Sanchez-Guardamino, Carlos e Íñigo) me lo he pasado teta, y al tener que explicarles una y otra vez el tema de mi tesis me han ayudado a afianzarla.

Los conocimientos que he ido adquiriendo durante esta tesis doctoral los he podido llevar a la práctica en Mallorca a través de la Consultoria Moscard Tigre. Quisiera agradecer a los municipios que han confiado en mi profesionalidad y que han llevado a cabo acciones de monitorización y control de mosquito tigre en sus zonas públicas. Agradecer a Andrea Drago por sus recomendaciones para poner en marcha esta consultoría. También agradecer a la Conselleria de Medi Ambient (Ivan Ramos y Joan Mayol) y a la de Sanidad (Mercedes Gumá y Ramón García) del Govern de les Illes Balears por tenerme en consideración como experto en mosquito tigre.

Y por último, y por ello lo más importante, agradecerle a mi querida esposa Isabel Cárdenas Sierra por todo su apoyo y comprensión a lo largo de estos años que he dedicado a esta tesis. Su ímpetu, su ánimo y su cariño han hecho posible que día a día me esforzase más para lograr mis objetivos. Siempre me ha aportado la chispa que me faltaba en los días infértiles, y ha achicado el agua que me ahogaba por motivos nimios. Le agradezco profundamente a su familia (Josema, Isabel, Rafa y Merce) el haberme acogido en su seno. Pero sobre todo gracias Isabel por compartir conmigo la mejor experiencia de mi vida, ser padres de Inés y de Pedro.

Y gracias al mosquito tigre!

Observo como abstraído,
apoyado en la baranda,
las olas que van y vienen
lamiendo la arena blanca

Vivencias Donostiarras
Juan Pedro Paulis Segura

Igual que el mosquito más tonto de la manada,
yo sigo tu luz aunque me lleve a morir.

*Letra 'Deseos de cosas imposibles'.
La Oreja De Van Gogh (2003)*

Desde el momento en que los invasores aparecieron, respiraron nuestro aire, comieron y bebieron, estuvieron condenados. Tras fracasar las armas y los recursos del hombre, fueron reducidos, destruidos, por las criaturas más diminutas que Dios, en su sabiduría, puso sobre la Tierra. Mil millones de muertos hicieron al hombre acreedor a su inmunidad, al derecho de sobrevivir entre los infinitos organismos de este planeta y ese derecho es nuestro, ante cualquier adversario pues el hombre no vive ni muere en vano.

La guerra de los mundos
Herbert George Wells

ACRÓNIMOS

Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i>
CDC	Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de EEUU
CIV	Control Integrado de Vectores
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
EEUU	Estados Unidos de América
EMCA	European Mosquito Control Association
GST	Enzimas Glutation S-transferasas
IA	Ingrediente Activo
IGR	Regulador de crecimiento
LC₉₉	Concentración que causa el 99% de mortalidad
MDT	Distancia media de vuelo
MSSSI	Ministerio de Sanidad, Seguridad Social e Igualdad
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pbo	Butóxido de Piperonilo
SIT	Técnica del Insecto Estéril
SCMBL	Servei de Control de Mosquitos del Baix Llobregat
UE	Unión Europea
ULV	Ultra Bajo Volumen
UV	Ultra Violeta

INDICE

0 RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1. Control Integrado de Vectores (CIV).....	5
1.1.1. Control Físico	6
1.1.2. Control biológico.....	7
1.1.3. Control bioquímico - IGRs.....	8
1.1.4. Control químico	10
1.2 Tratamientos Adulticidas.....	12
1.2.1 Biología de <i>Ae. albopictus</i> en relación a su control químico.....	13
1.2.1.1 Rango de vuelo.....	13
1.2.1.2 Horario.....	14
1.2.1.3 Lugares de reposo	15
1.2.2 Tratamientos Volumétricos en Ultra Bajo Volumen (ULV).....	16
1.2.2.1 Tamaño de partícula.....	18
1.2.2.2 Condiciones Meteorológicas.....	19
1.2.2.3 Verificación de eficacia.....	20
1.2.3 Tratamientos residuales por impregnación.....	21
1.2.3.1 Diseño tratamientos impregnación.....	24
1.3 Resistencia a Insecticidas.....	25
1.3.1 Bioensayo Tubo OMS.....	31
1.3.2 Ensayos Enzimáticos.....	32
1.3.3. Resistencias en <i>Ae. aegypti</i>	34
2. OBJETIVOS	37
3. METODOLOGÍA	39

4. TRABAJOS PUBLICADOS.....	43
4.1 Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against <i>Aedes albopictus</i> in the Baix Llobregat region, Spain.....	43
4.2 Laboratory tests of the residual effect of Deltamethrin on vegetation against <i>Aedes albopictus</i>	55
4.3 First data on resistance to pyrethroids in wild populations of <i>Aedes albopictus</i> from Spain.....	63
4.4 Resistencias a insecticidas de los principales vectores de dengue, chikungunya y Zika (diptera; culicidae). Implicaciones para España	69
5. DISCUSIÓN	77
6. CONCLUSIONES.....	89
ANEXO: Arbovirus transmitidos por <i>Ae. albopictus</i> en Europa y los métodos de control aplicados.....	91
APÉNDICE	95
Índices de impacto de las revistas y sus áreas temáticas.....	95
Justificación de la contribución del doctorando	96
ÍNDICE DE CONTENIDO	97
Tablas:	97
Gráficas:.....	97
Figuras:	98
Fotos:.....	98
BIBLIOGRAFÍA	99

0 RESUMEN

Debido a la importancia sanitaria y a las molestias causadas por el mosquito invasor *Ae. albopictus*, se ha de promover su control, siendo el Control Integrado de Vectores (CIV) el enfoque más racional para conseguirlo. Los tratamientos adulticidas, como solución última del CIV han sido pobremente estudiados en Europa, probablemente por los escasos brotes autóctonos de arbovirosis donde *Ae. albopictus* ha ejercido de vector. En esta memoria de tesis se han estudiado los dos principales métodos de aplicación de adulticidas: tratamientos volumétricos y de impregnación (sobre vegetación), evaluando diferentes aspectos de su eficacia frente a *Ae. albopictus*. Los tratamientos en ultra bajo volumen (ULV) con Deltametrina, aunque pueden alcanzar eficacias del 100% a los 25 metros en campo abierto y con condiciones meteorológicas favorables, tienen una persistencia reducida, pueden entrañar riesgos a causa de la deriva del producto y se adaptan mal a la biología de *Ae. albopictus*. Por otro lado, los tratamientos de impregnación de la vegetación alcanzan mejor las zonas de descanso de *Ae. albopictus* y confieren además una mayor persistencia, causando una mortalidad del 70% a los 19 días con Deltametrina, aunque este efecto residual puede favorecer la selección de poblaciones resistentes. El estado de susceptibilidad de 4 poblaciones españolas de *Ae. albopictus* también fue evaluado, comparándolo con las concentraciones discriminantes (Deltametrina 0.05%, Permetrina 1% y Cipermetrina 0.1%) obtenidas con una cepa susceptible de laboratorio. Se detectó por primera vez en Europa una población de *Ae. albopictus* resistente a un piretroide (Cipermetrina), lo que sugiere que el uso de adulticidas debería de estar mejor regulado, para que *Ae. albopictus* no llegue a desarrollar las resistencias que ya presenta *Ae. aegypti* en otras partes del mundo.

Due to the sanitary importance and the nuisance caused by the invasive mosquito *Ae. albopictus*, its control must be promoted, being the Integrated Vector Control (IVC) the most rational approach to achieve it. Adulticide treatments, as the IVC last solution, have been scarce studied in Europe, probably because the few autochthonous outbreaks of arbovirosis where *Ae. albopictus* has served as vector. In this dissertation, the two main methods of adulticide application have been studied: volumetric treatments and vegetation impregnation, evaluating different aspects of their effectiveness against *Ae. albopictus*. Ultra Low Volume (ULV) treatments with Deltamethrin can cause 100% mortality at 25 meters in open field with favorable weather conditions, but they achieve a reduced persistence, the risks caused by the drift of the product are high, and are not adapted to the biology of *Ae. albopictus*. On the other hand, the impregnation of vegetation reach the resting areas of *Ae. albopictus* and confer a longer persistence, causing 70% mortality after 19 days with Deltamethrin, although this residual effect may favor the selection of resistant populations. The susceptibility status to Pyrethroids of 4 spanish *Ae. albopictus* populations was also evaluated, comparing it with the discriminant concentrations (Deltamethrin 0.05%, Permethrin 1% and Cypermethrin 0.1%) obtained from a susceptible laboratory population. It was detected for the first time in Europe an *Ae. albopictus* population resistant to a Pyrethroid (Cypermethrin), which suggests a better regulation of adulticide uses, in order that *Ae. albopictus* does not develop the resistances that *Ae. aegypti* presents in other areas of the world.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

Aedes albopictus (Skuse 1894), más conocido como Mosquito Tigre, es un culícido originario del Sudeste Asiático. En las últimas décadas se ha expandido a través de varios países, tanto tropicales como de clima templado, quedando incluida en la lista de las 100 especies con mayor capacidad de invasión del mundo (Global Invasive Species Database 2013) (http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst.php). Su expansión se ha producido como consecuencia de la globalización, gracias al comercio internacional de neumáticos usados y plantas acuáticas (Moore y Michell, 1997; Enserink 2008, Benedict et al., 2007), utilizando además el tráfico terrestre como se ha visto en Europa (Medlock et al., 2012; Eirija et al., 2017). El marcado carácter sinantrópico de *Ae. albopictus* ha propiciado su expansión, que junto a la plasticidad climática y de focos de cría (Faraji et al., 2014) ha permitido que se asiente en aquellos lugares donde los humanos se han establecido (Paupy et al., 2009). Se considera que *Ae. albopictus* tiene una distribución peri-urbana (Hawley, 1988), pero su escaso rango de vuelo, su preferencia a refugiarse en la vegetación y la gran variabilidad de los focos de cría hace que su distribución se localice en “puntos calientes” o *Hot Spots*, donde alcanzan altas densidades poblacionales en zonas muy concretas (Unlu et al., 2016; Manica et al., 2016b).

Además de tratarse de un mosquito invasor, *Ae. albopictus* puede actuar como vector de arbovirus tales como el dengue, el chikungunya (ECDC, 2016a) o más recientemente el Zika (Wong et al., 2013; Di Luca et al., 2016) entre otros (Gratz, 2004). También es vector de varios tipos de encefalitis y filariasis (Medlock et al., 2012, Weaver y Reisen 2010, Gratz 2004; Cancrini et al., 2003; Mitchell 1995). En Europa ha actuado como vector de dengue y de chikungunya en Croacia, Francia e Italia (Rezza et al., 2007; Schmidt-Chanasit et al., 2010; Marchand et al., 2013; Delisle et al., 2015; Venturi et al., 2017; Calba et al., 2017; ECDC 2017a; ECDC 2017b) (ver Anexo), por lo que el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC) ha publicado guías para su monitorización y control (ECDC 2016a). En los análisis de riesgo de transmisión de enfermedades del ECDC se indica que en España se dan las condiciones necesarias para que se den brotes de chikungunya (ECDC, 2016b), dengue (ECDC, 2016c) y Zika (ECDC, 2016d). Aunque en el resto del mundo se le considera vector secundario de dengue, la capacidad vectorial de poblaciones Europeas con las cepas estudiadas es elevada (Vega-Rua et al., 2013), y es similar a la del *Ae. aegypti* en la transmisión de Zika (Ryckebusch et al., 2016) y chikungunya (Lounibos y Kramer 2016.). Estas enfermedades no son autóctonas en Europa, y por lo tanto solo son posibles a partir de un caso importado en fase virémica.

En 2004 *Ae. albopictus* fue citado por primera vez en España (Aranda et al., 2006). Desde entonces se ha expandido por la costa mediterránea, las Islas Baleares y el valle del Ebro (Collantes et al., 2016), con una probable segunda introducción en el País Vasco a través de la frontera con Francia (Delacour et al., 2015). En 2017 se detectó en Madrid (datos sin publicar). En España se encuentra incluido dentro del catálogo de especies exóticas invasoras (Real Decreto 630/2013), generado a partir de la Ley del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad (42/2007, artículo 64), que promueve el control y erradicación de las especies incluidas en dicho catálogo.

Las características biológicas de este mosquito implican una adaptación de los métodos de control empleados históricamente frente a otras especies. Las especies de culícidos que causan más problemática en nuestro país sobre humanos son *Culex pipiens* y *Aedes caspius* principalmente, el primero con una distribución más urbana y el segundo con una distribución más rural. *Ae. albopictus* presenta algunas características similares a *Culex pipiens* como criar en acúmulos de agua reducidos, tener un rango de vuelo corto y una distribución urbana, mientras que con *Ae. caspius* comparte su agresiva antropofilia, su actividad diurna y su capacidad de poner huevos de manera individualizada (Hamer et al., 2014; Ciota et al., 2012; Bogojević et al., 2011).

La presencia de un mosquito invasor vector de enfermedades con una etología diferente supone un reto para su control. Además de su importancia sanitaria antes expuesta, *Ae. albopictus* es un mosquito que produce muchas molestias y quejas ciudadanas, con repercusiones económicas considerables (Abramides et al., 2013). Ambos factores sitúan a este mosquito como diana en las campañas de control, tanto para mejorar la calidad de vida como para mantener densidades poblacionales bajas reduciendo así el riesgo de un brote de enfermedades. Estas campañas de control, según organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ECDC o la European Mosquito Control Association (EMCA), han de basarse en el control integrado de vectores, fomentando la eliminación de focos de cría mediante la concienciación ciudadana, así como la aplicación de larvicidas. Pero en situaciones de molestias intolerables o de riesgo epidémico de alguna enfermedad en la que un mosquito esté interviniendo como vector se recomienda el uso de adulticidas para reducir rápidamente el número de adultos y así evitar o frenar la transmisión. El uso de adulticidas es de hecho la única herramienta de choque disponible para frenar su evolución.

Los artículos que componen esta memoria de tesis tienen como unidad temática el uso de insecticidas para el control de individuos adultos de *Ae. albopictus*, como una herramienta más del control integrado de vectores. Los tratamientos adulticidas son sin embargo una herramienta polémica que debe ser muy tecnificada para lograr una eficacia satisfactoria y la máxima seguridad ambiental y humana. Su abuso generará resistencias a los insecticidas usados a largo o medio plazo, haciendo de ésta una herramienta poco sostenible. Se estudian los diferentes métodos de aplicación así como las resistencias a insecticidas generadas y se discute el posible manejo de las mismas.

Por lo tanto, el objetivo es ahondar en los controles adulticidas, evaluando las mejores soluciones posibles para el futuro, y determinando la resistencia a insecticidas que hayan podido generar las aplicaciones realizadas en el pasado. El conocimiento de los mejores métodos para la aplicación de adulticidas además del estatus de la susceptibilidad de las poblaciones de *Ae. albopictus* tratadas es, por todo lo expuesto, de vital importancia.

1.1. Control Integrado de Vectores (CIV)

La presente memoria de tesis está centrada en la aplicación de adulticidas y en los problemas resultantes de la aparición de resistencias. Aunque nos centremos en este tipo de control químico, se recuerda que la estrategia global a seguir frente a *Ae. albopictus* es el Control Integrado de Vectores (CIV), del cual solo una pequeña parte consiste en el uso de adulticidas.

El CIV es un tipo específico del control integrado de plagas (CIP), donde el objetivo, además de la reducción de la población de mosquitos, es frenar o evitar la transmisión de enfermedades cuando se produce (Erlanger et al., 2008). La OMS define el control integrado de vectores como “un proceso decisorio racional para la utilización óptima de los recursos para el control de vectores”, en la que se incluyen enfoques multisectoriales para mejorar la salud humana (OMS 2008). La OMS identifica 5 elementos clave para la correcta implantación del CIV:

- La participación ciudadana, potenciando las comunidades.
- La colaboración entre los responsables sanitarios y otros organismos a través de la utilización óptima de recursos, la planificación, el seguimiento y la toma de decisiones.
- La integración de todos los métodos de control de vectores químicos y no químicos (biológicos, mecánicos, culturales, etc...), y la integración con otras medidas de control de enfermedades.
- La toma de decisiones basada en la evidencia, mediante la evaluación de la vigilancia entomológica y epidemiológica.
- El desarrollo de recursos humanos mediante la formación, estructurando carreras profesionales para que desarrollen y gestionen programas de CIV.

Existen varios conjuntos de herramientas para el control de mosquitos, como las físicas, biológicas, ambientales o químicas. Cada método tiene sus ventajas e inconvenientes, no existiendo un método definitivo por sí solo, por lo que su integración es fundamental. Dentro del contexto del CIV, la selección y la planificación en el tiempo de un método o la combinación de varios debe estar basada en la monitorización del vector y en la relación coste/efectividad de la intervención para conseguir los resultados esperados. El término coste no se refiere únicamente al económico, sino que intervienen otros factores como toxicidad, ecotoxicidad y generación de resistencias, entre otros, todos los cuales han de ser tenidos en consideración. Por ello, los métodos químicos, como los adulticidas, han de ser empleados en última instancia debido a su elevado coste tóxico y medioambiental. El uso seguro de biocidas (adulticidas principalmente) utilizados en el control de mosquitos es crucial, puesto que en el caso de *Ae. albopictus* son aplicados en asentamientos humanos debido a su distribución antropocéntrica (EMCA 2013). Pese a ello, se constata que en la práctica el empleo de adulticidas es generalizado a nivel global, probablemente por una cuestión de costes, desconocimiento y falta de recursos técnicos.

En el caso concreto del control integrado de *Ae. albopictus*, la sensibilización ciudadana para reducir los focos de cría y la eliminación o tratamiento con productos biológicos de los mismos en las zonas de uso público han de constituir la base de estos programas. (Abramides et al., 2011; ECDC 2017c; Baldachino et al., 2017).

1.1.1. Control Físico

Este tipo de control busca interrumpir el ciclo de vida del mosquito al gestionar los acúmulos de agua, medio indispensable para el desarrollo larvario. Es el primer método de control que se debería de plantear, dado que cuando se encuentran los focos larvarios la eficacia es total y persistente, normalmente por eliminación de recipientes o por renovación del agua de manera semanal.

Existe una gran variedad de focos de cría en donde *Ae. albopictus* puede completar su ciclo larvario. Encontrarlos es la mayor dificultad en este tipo de control, teniendo en cuenta que suelen hallarse en zonas privadas (Abramides et al., 2011). Una vez hallados, y dado que suelen ser pequeños acúmulos de agua en elementos antropogénicos, son sencillos de retirar, cubrir, vaciar, volcar o cualquier otro proceso físico que impida que el agua quede acumulada. Se puede acumular agua (agua de consumo humano, agua de lluvia para riego o agua de desagües de aire acondicionado entre otras), pero deberá estarlo en recipientes que impidan el acceso a los mosquitos, evitando así que éstos depositen sus huevos. (Abramides et al., 2011; Richards et al., 2008). En este ámbito existen también productos no registrados como biocidas aunque ejercen un claro efecto larvicida, puesto que actúan mediante un efecto físico al crear una capa de polímeros siliconados (polidimetilsiloxano) en la interfase agua-aire que impide la respiración de las larvas y puesta de huevos (Sukanon et al., 2016).

Las hembras de *Ae. albopictus* no depositan sus huevos directamente en la lámina de agua, sino que los colocan en zonas superiores no inundadas, a la espera de que un futuro incremento del nivel del agua permita su eclosión. Esto dificulta mucho la detección de estos focos de cría, ya que en el momento de la inspección pueden estar secos, pero pueden contener huevos viables durante dos meses (Zheng et al., 2015) o incluso entrar en diapausa (Thomas et al., 2012).

Conocer la etología de *Ae. albopictus* es fundamental para localizar estos focos de cría, que se suelen encontrar en lugares oscuros y sombríos. Dado que pueden compartir focos de cría con otras especies de mosquitos autóctonos, las medidas de control físico ayudarán al control de mosquitos en general (Abramides et al., 2013). Las campañas de sensibilización ciudadana tienen como objetivo promover este tipo de acciones, reduciendo así los focos de cría en propiedades privadas.

1.1.2. Control biológico

El uso del control biológico se centra principalmente en la fase larvaria del *Ae. albopictus*, afectando a la fase adulta únicamente los hongos entomopatógenos como *Coelomomyces stegomyiae* var. *stegomyiae* (Scholte et al., 2004) o *Metarhizium anisopliae* (Scholte et al., 2007; Bilal et al., 2012; Lee et al., 2015). La fase adulta carece de depredadores naturales efectivos, y algunas metodologías propuestas como el uso de murciélagos carecen de base lógica y científica. Dentro del control biológico de larvas tenemos los siguientes agentes:

- **Depredadores:** Han de ser especies autóctonas por ley. Son métodos poco utilizados ya que implican su cría masiva, y la necesidad de mantener las condiciones en el foco de cría estables y óptimas para los depredadores.
 - o Peces larvívoros: Por tamaño y transitoriedad, los focos de cría de *Ae. albopictus* no suelen ser compatibles con su desarrollo.
 - o Copépodos:
 - *Macrocyclus albidus* (Veronesi et al., 2015; Marten 1990): Aunque existe experimentación al respecto, no se emplean actualmente en el control de larvas de *Ae. albopictus*.
- **Bacterias:** Son el método de control larvario más empleado actualmente y están basados en la actividad entomopatógena de proteínas cristalizadas (4 tipos principalmente) que se forman dentro de las esporas de algunas bacterias (cuerpo parasporal). Esta proteína, una vez ingerida por la larva, afecta a las células epiteliales de su estómago, provocando su lisis y la muerte del individuo. (Chilcott et al., 1990).
 - o *Bacillus thuringiensis israeliensis*. (*Bti*). Además de los mosquitos también afecta a otros dípteros con fases larvianas acuáticas como simúlidos y quironómidos. El *Bti* es fácil de manejar y con nulos efectos negativos en la salud humana y en el ecosistema. Su uso en agua potable está autorizado (OMS 2011a)
 - o *Lysinibacillus sphaericus* (anteriormente *Bacillus sphaericus*). De efectos similares al *Bti* pero con una persistencia muy superior. Es especialmente efectiva frente al género *Culex*, aunque debido a la aparición de resistencias no se suele usar en solitario sino en combinación con el anterior en formulaciones que han demostrado su eficacia frente a *Ae. albopictus* (Eritja 2013).
 - o *Saccharopolyspora spinosa* (Spinosa). Tiene un modo de acción diferente, excitando las células del sistema nervioso central
- **Otros Métodos:** aunque no son propiamente métodos biológicos, existen métodos de control reproductivo que podrían tener cabida en este apartado (Corbel et al., 2017):
 - o *Técnica del Insecto Estéril* (SIT): Consiste en la cría masiva de mosquitos, la selección de machos, su esterilización (mediante radiación o mediante modificaciones genéticas), y su suelta en el medio natural para que compitan con los machos salvajes en la fecundación de las hembras, las cuales depositarán huevos infértiles.
 - o *Wolbachia*: Bacteria heredable que interfiere en la compatibilidad de cepas de *Ae. albopictus* a nivel de cigoto.

1.1.3. Control bioquímico - IGRs

El control bioquímico está dirigido a las fases larvianas de *Ae. albopictus*, y utiliza productos que interfieren en los procesos fisiológicos, afectando al correcto desarrollo larvario (Becker et al., 2013). Estos productos son conocidos como reguladores de crecimiento (IGRs). Son bastante específicos, actuando en momentos puntuales del ciclo biológico de los mosquitos. Hay dos tipos de IGRs en función de su modo de acción:

- **Inhibidores de síntesis de quitina:** Interfieren en la formación de la nueva cutícula, afectando fatalmente al proceso de muda. Inhiben la acción de la enzima quitinsintetasa, que es la encargada de la polimerización de la *N*-acetilglucosamina, el último paso del proceso de síntesis de la quitina. Sus efectos no se producen inmediatamente tras el tratamiento, sino que aparecen cuando las larvas realizan la siguiente muda, al eliminar la vieja cutícula (ecdisis). En función de la dosis los efectos adversos en la síntesis de quitina pueden ser mayores o menores:
 - Ausencia de muda, por lo que el individuo muere dentro de la vieja cutícula.
 - Inicio de muda pero no completada, bien por la ausencia de formación de la nueva cutícula o porque la vieja cutícula se queda adherida a los últimos segmentos abdominales impidiendo un movimiento libre.
 - Muda completa pero la vieja cutícula se queda adherida a la cabeza de la larva impidiéndole alimentarse.

El único inhibidor de síntesis de quitina registrado en la Unión Europea es el Diflubenzurón (Directiva 2013/6/EU). Esta materia activa fue descubierta como resultado de unir dos herbicidas: Dichlonebil y Diuron. Esta mezcla no tenía efectos herbicidas, pero se observó que era tóxica para los insectos. Algunas de sus características principales son:

- Al igual que los demás productos larvicidas, su forma de acción es mediante ingestión, por lo que la aplicación se ha de realizar en los momentos en los que las larvas se están alimentando.
- Si se tratan larvas de menor desarrollo larvario (L1 y L2) necesitarán ingerir menos cantidad de producto para ser intoxicadas. Este mismo efecto se da con el *Bti*.
- El pico de actividad tóxica tiene lugar durante la síntesis de quitina, siendo el momento más susceptible para realizar los tratamientos, aunque estos han de tener la suficiente actividad residual como para que sean persistentes entre dos procesos de muda, ya que toda la población no muda a la vez. Esto es conocido como “ventana de actividad”.
- La eficacia del tratamiento debería de determinarse sobre la emersión de adultos, puesto que su efecto no es inmediato.
- El Diflubenzurón tiene una especificidad muy baja, por lo que no debería de usarse en ecosistemas acuáticos con alta diversidad de insectos.

- **Análogos de hormonas juveniles:** Estas sustancias mimetizan y suplantán las hormonas juveniles naturales, encargadas del proceso de la metamorfosis en la fase larvaria y de la maduración de los ovarios y la producción de feromonas en la fase adulta. Los análogos de hormonas juveniles pueden ser efectivos incluso sobre fases larvarias avanzadas. Una de sus ventajas es que su estructura química (terpenoides) les permite penetrar fácilmente en la cutícula del insecto y llegar hasta la epidermis, encargada de secretar toda la cutícula, por lo que no hace falta que la larva lo ingiera. La eficacia de los tratamientos hay que determinarla con la emergencia de los adultos al igual que con los IGRs. Es habitual de hecho encontrar larvas vivas que no llegarán a pupar.
 - o El Metopreno es uno de los productos de control de mosquitos más empleados en EEUU, con una toxicidad para humanos muy reducida con una DL_{50} (cantidad de producto que se ha de ingerir para provocar la muerte del 50% de sujetos) superior a 34,5 Kg/Kg de peso del sujeto).
 - o El Piriproxifen tiene una persistencia muy elevada, de hasta 70 días tras el tratamiento, incrementándose ese período en aguas con mucha carga orgánica. Se cree que el Piriproxifen es absorbido por esa materia orgánica en descomposición, por lo que aunque el agua sea renovada seguirá siendo tóxica para las larvas (Mulligan y Schaefer 1990).

Aunque los IGRs suelen aplicarse habitualmente sobre los focos de cría de forma directa, recientemente está suscitando interés su autodiseminación. Este método consiste en una ovitrampa impregnada con un IGR (Piriproxifen), el cual se adhiere a las patas y al abdomen de las hembras de *Ae. albopictus* que se posan a depositar huevos. Este larvicida es transportado por el mismo mosquito hasta otros lugares de cría, ya que las hembras de *Ae. albopictus* no depositan todos sus huevos en el mismo foco de cría. En este nuevo foco de cría “natural”, el larvicida transportado por la hembra de mosquito matará tanto a su propia descendencia como a las larvas que se hallaban previamente en ese lugar (Caputo et al., 2012; Snetselaar et al., 2014). Con esta metodología se redujo en un 96- 98% la emergencia de adultos de *Ae. aegypti* en recipientes no tratados en zonas poco pobladas de Brasil, con una densidad de 1,53 puntos de diseminación de larvicida/hectárea (Abad-Franch et al., 2017) (Ver 1.1.1.5.3 de la presente memoria de tesis). También se utilizan IGRs para obtener ovitrampas ovicidas, en las que los huevos no llegan a eclosionar o donde las larvas no llegan a pupar (Harburguer et al., 2016)

1.1.4. Control químico

El control químico generalmente se asocia a productos adulticidas, aunque éstos también pueden tener un efecto larvicida. Según la OMS el control de *Ae. albopictus* adultos debería reducirse a dos escenarios (OMS, 2006):

- Intervención activa en la transmisión de arbovirus. Es decir, durante un brote epidémico en el que *Ae. albopictus* esté actuando como vector.
- Altas densidades poblacionales puntuales que pueden suponer la base de la rápida evolución epidemiológica de un caso virémico compatible importado.
- o Adicionalmente, existe un cierto consenso social en admitir también el uso de adulticidas en situaciones puntuales de gran molestia en el área pública, las cuales fueran imposibles de resolver mediante otras herramientas del CIV.

A la hora de usar adulticidas, la OMS ha editado una guía sobre la valoración de riesgos para su uso racional (OMS 2004). Su toxicidad, ecotoxicidad y capacidad de generar resistencias en los mosquitos implica que los adulticidas deben ser considerados en última instancia y su aplicación suele acarrear cierta controversia.

Los tratamientos adulticidas son el método de control menos racional, ya que suponen un elevado coste para una baja eficacia a largo plazo. En comparación con el control larvario, considerado como un método de control preventivo que debe realizarse rutinariamente, el control de adultos tiene un efecto paliativo puesto que busca reducir bruscamente el elevado tamaño poblacional previo al tratamiento. Pese a todos sus inconvenientes, el uso de adulticidas actualmente es el único método de control eficaz para la interrupción de la transmisión de enfermedades.

Todos los productos biocidas para el control de *Ae. albopictus*, tanto para el control biológico (excepto depredadores), como el control bioquímico así como el control químico, han de estar registrados de acuerdo al Reglamento (UE) nº 528/2012 relativo a la comercialización y el uso de los biocidas (BPR) (anteriormente Directiva 98/8/CE). Estos reglamentos promueven la comercialización de las materias activas menos tóxicas, más respetuosas con el medio ambiente y más eficaces. Existen 23 tipos de productos biocidas (alguicidas, herbicidas o, desinfectantes entre otros), siendo el grupo 18 el que engloba a todos los insecticidas y el 19 a todos los repelentes. Para que una materia activa sea aceptada se ha de presentar un expediente con sus características físicas, tóxicas, ecotoxicológicas y de eficacia, el cual es evaluado por los países miembros. Este proceso de revisión es largo y costoso, por lo que la decisión de defender cada materia activa depende principalmente del beneficio económico que las empresas productoras esperen obtener a cambio, restando los costes de acreditación. Estas trabas y la falta de interés comercial en su defensa acaban reduciendo el número de familias y de compuestos que pueden ser empleados en la actualidad tanto frente a mosquitos, como frente a otros insectos. En cambio los productos disponibles actualmente son productos más seguros.

Una reciente revisión bibliográfica de la ECDC (ECDC 2017c) sobre el control vectorial de *Ae. albopictus* recopila los productos y métodos recomendados por diferentes informes técnicos nacionales y artículos científicos a nivel Europeo. Como productos adulticidas generalmente se emplean Piretroides, siendo la Deltametrina la más común (Tabla1).

País	Documento	Materias Activas Recomendadas
Comunidad Europea	EMCA 2013	Piretrinas y Piretroides
Francia	CNEV 2016	Piretroides (Deltametrina)
	DGS 2012	Cualquier formulado aprobado
	DGS 2013	Piretroides y Organofosforados, (Permetrina y D-phenotrina para tratamientos aéreos)
	DGS 2015	Piretrinas naturales en escenarios de poco riesgo, y Piretroides (Deltametrina) para escenarios de mayor riesgo
Italia	MS 2016	Piretroides (Ciflutrina, Cipermetrina, Deltametrina, Etofenprox, Permetrina y Tetrametrina)
	Romi et al., 2009	Piretrinas y Piretroides (Bifentrin)
	RV 2009	Piretrinas de primera generación para un Knock-down rápido. Piretrinas de segunda o tercera generación foto-estables para acción residual.
	SSRER 2016	Piretroides y Piretrum
Países Bajos	RIVM 2012	Deltametrina (Aqua K-otrhina)
España	MSSI 2016	Cualquier formulado aprobado

Tabla 1: Materias activas adulticidas recomendadas por diferentes documentos técnicos a nivel Europeo (Modificado de ECDC 2017c)

En el siguiente punto de la presente memoria de tesis se profundiza más sobre los diferentes tipos de tratamientos y aspectos del control químico.

1.2 Tratamientos Adulticidas

La presente memoria de tesis se centra en la aplicación de productos adulticidas para el control de *Ae. albopictus*, lo cual constituye una pequeña parte del CIV. Los artículos 4.1 y 4.2 tratan sobre varios aspectos que influyen en la eficacia de los tratamientos adulticidas, evaluados en aplicaciones reales. Estos métodos están descritos en abundante bibliografía, como el manual de la OMS “Pesticides and their application” (OMS 2006a), el cual diferencia estos dos tipos de tratamientos adulticidas:

- Tratamientos volumétricos
- Tratamientos residuales por impregnación

Aunque estos tipos de tratamientos se desarrollarán más adelante (1.2.2 y 1.2.3), en el primer caso supone la aplicación de bajas dosis de insecticida para eliminar los mosquitos presentes en un determinado espacio aéreo, con un efecto rápidamente transitorio, mientras que en el segundo caso supone la aplicación de dosis muy superiores sobre una superficie diana (con o sin presencia del mosquito en el momento de la aplicación) con la idea de obtener un efecto letal residual.

La elección del tipo de tratamiento a emplear está condicionada por el objetivo buscado, la estrategia deseada y por el escenario en el que ha de ser realizado, que es la suma de las características geográficas, vegetales, constructivas, climatológicas y de habitabilidad del entorno sobre el que se va a realizar el tratamiento. El éxito del tratamiento dependerá de la correcta elección del tipo empleado, sumando todos estos factores al conocimiento de la biología de *Ae. albopictus* y de su estatus de susceptibilidad frente a insecticidas. La falta de información científica a la hora de realizar esta elección entre los tratamientos adulticidas justifica la presente memoria de tesis.

Respecto a las metodologías de aplicación, se han de seguir las indicaciones descritas en la Directiva 2009/128/CE sobre el uso sostenible de los plaguicidas, que aunque esté descrita para productos fitosanitarios también se aplica por extensión a los productos biocidas. Su objetivo es: “conseguir un uso sostenible de los plaguicidas mediante la reducción de los riesgos y los efectos del uso de los plaguicidas en la salud humana y el medio ambiente, y el fomento de la gestión integrada de plagas y de planteamientos o técnicas alternativos, como las alternativas no químicas a los plaguicidas”. Su artículo 9.1 prohíbe las aplicaciones aéreas, aunque bajo determinadas circunstancias justificadas si las permite.

La normativa conlleva múltiples restricciones y medidas de seguridad a la hora de llevar a cabo tratamientos adulticidas, puesto que se ha de garantizar la ausencia total de personas y animales durante el tratamiento y el plazo de seguridad indicado, tomando medidas de seguridad (personales y generales), y documentando la intervención con toda la información posible (producto, dosificación, área tratada, medidas de seguridad previas y posteriores al tratamiento entre otras muchas).

1.2.1 Biología de *Ae. albopictus* en relación a su control químico.

La particular biología de *Ae. albopictus* hace que los métodos de control integrado tengan que ser adaptados a la misma, también los métodos de control químico. Estas particularidades benefician o perjudican los diferentes tipos de tratamientos que hemos descrito anteriormente. A continuación se exponen algunos aspectos de la biología de *Ae. albopictus* que pueden influir en la aplicación de adulticidas.

1.2.1.1 Rango de vuelo.

Ae. albopictus no es un mosquito que se caracterice por sus capacidades de vuelo. Se estima que una hembra de *Ae. albopictus* puede desplazarse de 200 a 500 metros en toda su vida (Lacroix et al., 2009). Un estudio llevado a cabo con mosquitos (machos y hembras) marcados con polvos fluorescentes en Roma obtuvo una distancia de vuelo media (MDT) de 119 metros diarios, aunque la gran mayoría de mosquitos permanecían a no más de 200 metros del punto de suelta 9 días después (Marini et al., 2010). Un estudio paralelo llevado también en Italia únicamente con machos obtuvo unos MDT algo superiores (97,6 – 212 metros), con el 95% de los mosquitos en los 174 – 307 metros desde el punto de suelta tras 7 días, verificando además que el modo de marcado con polvos fluorescentes frente a marcados con *Wolbachia* podía reducir su rango de vuelo (Bellini et al., 2010). En Singapur, en un ensayo con hembras alimentadas con sangre marcada con Rubidio, se determinó que depositaban sus huevos a una distancia máxima de 320 metros desde el punto de suelta (Liew y Curtis 2004). En este mismo ensayo se determinó su capacidad de dispersión vertical, a través de las terrazas de edificios de 21 plantas (liberándolos en la planta 12), verificando su rápida dispersión desde la planta 0 hasta la 21. En un estudio realizado en los vasos de flores encontrados en cinco niveles altitudinales de nichos de un cementerio catalán, se determinó que no había diferencias en densidades de poblaciones larvarias según la altura, y hasta un nivel cercano a los 6 metros (Eritja & Herreros 2017), lo que corrobora los datos anteriores. En cambio, otro estudio sobre oviposición vertical llevado a cabo en EEUU, usando árboles en vez de edificios, observó la preferencia de *Ae. albopictus* a depositar los huevos en recipientes colocados a ras de suelo (Williges 2014).

El reducido rango de vuelo hace que los adultos se concentren cerca de los focos de cría, o en los lugares donde se dan sus condiciones ambientales preferidas (punto 1.2.1.3 de la presente memoria de tesis). Esto ha de ser tenido en cuenta a la hora de realizar tanto tratamientos volumétricos como de impregnación, ya que favorece este tipo de estrategia.

1.2.1.2 Horario

Se considera que *Ae. albopictus* es un mosquito diurno (aunque también pueden presentar cierta actividad nocturna), con dos picos de actividad: unas horas después del amanecer y un pico más activo algunas horas antes del anochecer (Delatte et al., 2010). Tienen una menor actividad durante las horas más cálidas del día (Figura 1).

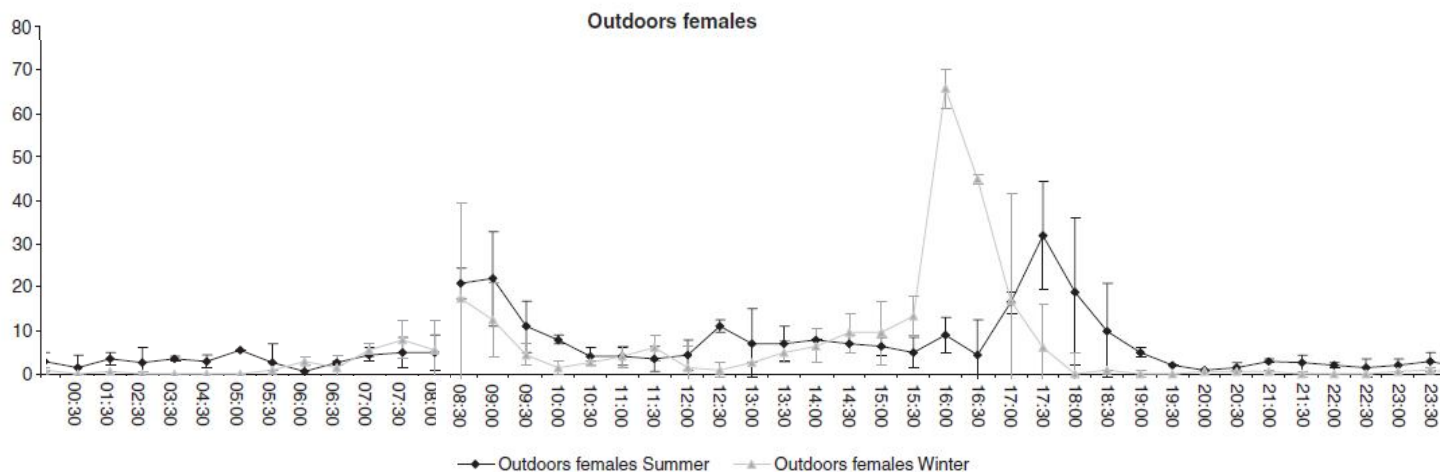


Figura 1: Actividad de *Ae. albopictus* a lo largo de 24 horas en zona tropical (modificado de Delatte et al., 2010).

Los tratamientos volumétricos buscan principalmente el contacto de las gotas de insecticida con los mosquitos que estén volando, por lo tanto el momento en el que se hace la aplicación ha de ser muy preciso, adaptándose a la especie diana y a las mejores condiciones atmosféricas. Afortunadamente la actividad de *Ae. albopictus* coincide con las mejores condiciones atmosféricas descritas en el punto 1.2.2.2 de la presente memoria de tesis, coincidiendo a primera hora de la mañana.

En algunos tratamientos contra *Ae. aegypti*, la falta de sincronización entre aplicaciones ULV y los picos de actividad de esta especie (similares a las de *Ae. albopictus*), han sido una causa de ineficacia de los mismos (Hudson, 1986). Por el contrario, en otras experiencias, tratamientos ULV nocturnos han conseguido buenos resultados frente a *Ae. albopictus* (Farajollahi et al., 2012), muy probablemente debido a la mortalidad secundaria (mortalidad causada por el insecticida depositado en superficies de descanso).

En tratamientos de impregnación, el horario de aplicación no influye en el éxito del tratamiento, ya que una persistencia prolongada afectará a los mosquitos que tarde o temprano se posen sobre la vegetación tratada.

1.2.1.3 Lugares de reposo

Se considera a *Ae. albopictus* una especie exófila, es decir, que descansa fuera de nuestras viviendas, principalmente en la vegetación, siendo visitantes oportunistas de domicilios para encontrar alimento (Bohart 1957; Hawley 1988; Gratz 2004). En comparación, *Ae. aegypti* se considera una especie endófila puesto que tiene una fuerte tendencia a penetrar en las viviendas.

Respecto a las preferencias de vegetación, únicamente conocemos una publicación que describe las especies vegetales preferidas por *Ae. albopictus* para descansar. Samson et al. (2013) describió cómo *Ae. albopictus* prefiere descansar sobre vegetación densa, aunque no existía una relación directa entre los tamaños foliares de las plantas y el número de mosquitos posados sobre ellas.

Otros autores han descrito los lugares de descanso preferidos como la vegetación densa en zonas sombrías (Estrada-Franco y Craig 1995; Hawley 1988), con arbolado (Cianci et al., 2015) o los cementerios (Champion y Vitek 2014). *Ae. albopictus* podría preferir a priori vegetación de hoja ancha (Doyle 2007), la cual, lógicamente, es frecuente en zonas sombrías. Por este motivo, y por observaciones personales, para el artículo 4.2 de la presente memoria de tesis se eligió hiedra (*Hedera helix*) como especie representativa de descanso para *Ae. albopictus*.

Estas plantas de hoja ancha, que forman una cobertura vegetal densa, suelen crear un microclima en su interior con una humedad relativa superior a la exterior, menor radiación solar directa (Cianci et al., 2015), y ausencia de viento, por lo que los adultos de *Ae. albopictus* pueden descansar con tranquilidad y sin sufrir estrés hídrico. Los *Ae. albopictus* adultos suelen descansar en el envés de las hojas (Doyle 2007), quedando incluso más protegidos a las radiaciones solares. Cuando se dan éstas condiciones idóneas de descanso y existe un punto adecuado de producción larvaria en las proximidades, puede darse una elevada concentración de *Ae. albopictus*.

Este tipo de vegetación y la elección de descansar en el envés afecta negativamente a los tratamientos volumétricos, ya que impide que las gotas de insecticida entren en contacto directo con los mosquitos adultos. Por otro lado favorecen los tratamientos de impregnación, ya que existe una mayor superficie que puede ser tratada y por lo tanto más cantidad de insecticida entrará en contacto con el mosquito, aunque ha de prestarse atención a tratar el envés de la hoja principalmente). Al estar en zonas sombrías, el efecto de la foto-oxidación del biocida tampoco es tan severo.

1.2.2 Tratamientos Volumétricos en Ultra Bajo Volumen (ULV)

La aplicación de adulticidas puede ser realizada mediante tratamientos volumétricos siendo el ULV la metodología más empleada. No deben confundirse ambos conceptos referidos al volumen; en el caso del tratamiento volumétrico se refiere a la aplicación de un biocida en un espacio de la atmósfera, mientras que el ULV se refiere a la cantidad de biocida utilizado en la aplicación. Esta tecnología se utiliza principalmente desde vehículos, lo que permite una aplicación rápida en áreas extensas (OMS 2006a; Alarcón-Elbal et al., 2011). Por definición, los tratamientos ULV consisten en la aplicación del mínimo volumen efectivo del producto formulado dispersado mediante gotitas de gran flotabilidad (Mount, 1998). También se suelen denominar tratamientos de niebla fría, en comparación con tratamientos mediante termonebulización, que dispersan el insecticida mediante calentamiento. Esta metodología está recomendada por la OMS para combatir culícidos, aunque debería de ser evaluada para el control de *Ae. aegypti* y de *Ae. albopictus* ya que no suele alcanzar la totalidad de los lugares de descanso de estas especies (Esu et al., 2010; Boubidi et al., 2016).

Los primeros tratamientos ULV fueron realizados con avionetas para el control de plagas que afectan a cultivos de maíz (saltamontes y *Oulema melanopus*) usando malatión (Messenger, 1963). Frente a mosquitos se comenzaron a utilizar en 1965 para controlar los mosquitos de las marismas con Malatión (Knapp y Roberts 1965) y otros formulados (Glancey et al., 1965), obteniendo muy buenos resultados en la reducción de estas poblaciones. Este éxito obtenido con las aplicaciones ULV aéreas propició el desarrollo de la tecnología apropiada para realizar tratamientos terrestres, inicialmente por el ejército de EEUU (Mount et al., 1968) y posteriormente a nivel comercial, registrados en la Agencia de Protección del Medio de EEUU (US-EPA). La aplicación ULV terrestre fue rápidamente adoptada por los servicios de control de mosquitos en todo el mundo. Los tratamientos ULV aéreos y terrestres han sido el método estándar de control de mosquitos adultos desde los años 70, aunque implementarlos como la base de un programa de control de mosquitos es irracional e inviable (Bonds 2012). El uso indiscriminado y rutinario de tratamientos ULV, demandado en ocasiones por una ciudadanía deseosa de acciones municipales más llamativas que los controles larvarios puede llevar a graves problemas toxicológicos, ecotoxicológicos y de generación de resistencia a insecticidas.

Los tratamientos ULV generan una nube de gotitas de insecticida suspendida en la masa de aire que tienen como objetivo impactar sobre los mosquitos que estén volando en ese momento, causando una mortalidad denominada como mortalidad de choque o primaria. Las gotitas de insecticida que no impacten acabarán cayendo sobre el suelo o la vegetación donde podrán producir una mortalidad secundaria, aunque se considera como marginal y no es el objetivo de los tratamientos ULV. Este efecto inmediato únicamente sufrido por la población de mosquitos adultos presentes durante el tratamiento obliga a que se hayan de realizar tratamientos secuenciales para controlar los adultos que continuamente estén emergiendo de los focos de cría.

Como se ha comentado anteriormente, los tratamientos ULV frente a mosquitos fueron ideados para tratar marismas, donde la vegetación es baja y por lo tanto el insecticida puede dispersarse homogéneamente sobre una amplia superficie de terreno. En el caso de *Ae. albopictus*, cuyos lugares de descanso suelen localizarse en zonas ajardinadas habitualmente alejadas de la calles (patios traseros) y entre la vegetación (1.2.1.3) la dispersión del tratamiento ULV montado sobre vehículo puede no ser suficientemente homogénea, creando áreas que reciben una concentración sub-letal o no llegando siquiera a alcanzar muchas de las zonas críticas donde se encuentra este mosquito (Boudibi et al., 2016; Unlu et al., 2016). Hay que tener también en cuenta el efecto irritante de los Piretroides, repeliendo a los mosquitos hacia zonas no tratadas antes que su muerte, con las consiguientes repercusiones.

A la hora de diseñar un tratamiento ULV, por lo tanto, es esencial planificar el recorrido que llevará el vehículo sobre el que se ha montado la maquinaria, delimitando las zonas que realmente quedarán tratadas. Conocer el alcance real del tratamiento y las eficacias esperadas a todas las distancias ayudará a diseñar este recorrido correctamente. Dado que la nube de gotas generada en un tratamiento volumétrico ULV tiene una gran flotabilidad, las turbulencias atmosféricas influirán significativamente, así como la presencia de edificios o de vegetación alta y densa. El alcance del tratamiento, y las eficacias conseguidas en cada punto dependerá de una serie de factores que tendrán que ser asumidos al realizar cualquier tratamiento ULV, cuya gestión corresponde a un operador experimentado.

Por ello en el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis se han estudiado situaciones reales de tratamientos ULV (Foto 1) con el objetivo de evaluar la eficacia de las aplicaciones de adulticidas llevadas cabo por el Servei de Control de Mosquits del Baix Llobregat (SCMBL). Ante un nuevo marco legislativo, que obligaba al cambio de productos fitosanitarios a productos biocidas para controlar mosquitos (Directiva 98/8/CE), se evaluó la eficacia de los tratamientos realizados con la nueva formulación empleada. En situaciones reales no siempre se dan las condiciones idóneas de aplicación (con un viento calmado y constante a favor del tratamiento), por lo que se evaluaron también en condiciones adversas. Además del efecto choque, se evaluó la mortalidad secundaria causada por la vegetación tratada.



Foto 1: Maquinaria ULV montada sobre vehículo, empleada en el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis realizando un tratamiento adulticida

A continuación se profundiza sobre éstos factores, los cuales junto con las características biológicas de *Ae. albopictus* expuestas en el punto 1.2.1 de la presente memoria de tesis, intervendrán en el éxito de los tratamientos ULV.

1.2.2.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula ha de ser lo suficientemente pequeño como para producir el número suficiente de gotas que aumenten la probabilidad del contacto insecticida-mosquito, y lo suficientemente grande como para adherirse a la superficie del cuerpo de los mosquitos adultos (Mount, 1970). Para tratamientos terrestres, el $DV_{0.5}$ (diámetro por debajo del cual se integran el 50% de las gotas) recomendado es de 12 a 20 micras (Bonds 2012) (Figura 2). De hecho, una de las características necesarias para considerar un tratamiento como de ULV es que el diámetro medio de las gotas (VMD) sea inferior a $25\text{ }\mu\text{m}$ y el 90% del volumen esté distribuido en gotas inferiores a $50\text{ }\mu\text{m}$ (AFPMB, 2011). Gotas superiores a los $25\text{ }\mu\text{m}$ caen rápidamente al suelo, reduciendo su alcance longitudinal en el flujo de aire así como el tiempo durante el cual pueden entrar en contacto con un mosquito, mientras que gotas más pequeñas no llegan a contener la dosis letal necesaria para abatir a los mosquitos y aumentan susceptiblemente la deriva, pudiendo alcanzar zonas no deseadas (Tabla 2).

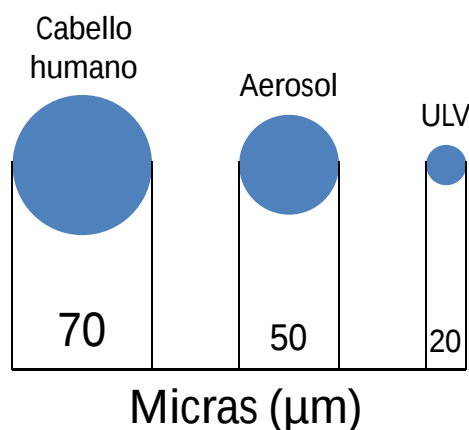


Figura 2: Diámetro medio de diferentes gotas en comparación con un cabello humano (www.InsectCop.net)

Para determinar el tamaño de partícula en tratamientos ULV se suelen utilizar 3 tipos de métodos: PDCDC-3 (prueba de hilo caliente), portaobjetos con teflón o portaobjetos con silicona. También se pueden utilizar papeles hidrosensibles, aunque este método no es aconsejable para medir gotas de un tamaño inferior a $50\text{ }\mu\text{m}$ (Hoffman y Hewitt 2005), ya que éstas no contienen suficiente agua como para cambiar la coloración del papel. Por restricciones materiales, éste ha sido el método empleado en el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis.

Diámetro de gota (μm)	Tiempo de caída desde 10 m	Densidad de gotas (nº/mm ³)
1	93,7 horas	1.000.000.000
5	3,7 horas	8.000.000
10	56 minutos	1.000.000
20	14 minutos	125.000
50	135 segundos	8.000
100	36 segundos	1.000

Tabla 2: Características de las gotas en función de su tamaño. (WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5)

1.2.2.2 Condiciones Meteorológicas

Los tratamientos ULV producen una nube de micro-gotas con una velocidad baja de sedimentación (Tabla 3), por lo que quedan expuestas durante largo tiempo a las condiciones atmosféricas. La gravedad mueve las gotas hacia abajo, y el viento las mueve longitudinalmente, creando turbulencias, por lo que la concentración de insecticida a lo largo de toda la pluma de aplicación no es homogénea (Thistle 2000). En Europa, la mayoría de las maquinarias de aplicación ULV rompen las gotas mediante una potente corriente de aire (a más de 120 Km/h iniciales) generada por una turbina, la cual proporciona un impulso inicial a las gotas hacia la zona a tratar.

El viento es considerado uno de los parámetros principales que influyen en la eficacia de un tratamiento ULV, debido a la deriva que puede generar en la nube de gotas (Tabla 3). Los cambios en la estabilidad de la atmósfera, principalmente la convección, también hay que tenerlos en cuenta para determinar la hora idónea a la que programar los tratamientos. Si la temperatura de la capa inferior de aire es mayor que la temperatura de la capa superior, el aire tenderá a subir por la densidad del mismo (convección), elevando también la nube producida por el tratamiento ULV alejándolo de la zona a tratar. Por el contrario, si la temperatura de la capa inferior es menor, el aire cercano al suelo no se elevará y no se generarán turbulencias, teniendo así una atmósfera estable. En esta atmósfera estable, la nube de gotitas generada por el tratamiento ULV se concentrará en la zona en la que se ha aplicado, lo que ocurre también en situaciones donde no existe diferencia de temperatura, con una atmósfera neutral (Bache y Johnstone, 1992). La baja eficacia obtenida en muchos tratamientos adulticidas suele ser debida a no tener en cuenta el sistema atmosférico y las turbulencias que se generan.

Las condiciones ideales de acuerdo con la OMS serían (OMS 2003):

- Velocidad del viento: 1-4 m/s (3,6 – 15 Km/h), sin superar los 15 Km/h.
- Dirección del viento: El tratamiento se ha de realizar a favor del viento con una inclinación máxima de 25 grados.
- Temperatura del aire: Cuando la temperatura de las capas inferiores es inferior a las capas superiores, lo cual suele ocurrir al amanecer.

Como se ha señalado, *Ae. albopictus* prefiere descansar entre la vegetación y en el envés de las hojas, donde la nube de gotas del biocida es filtrada, reduciendo los impactos entre las gotas con los mosquitos. Realizar los tratamientos a favor del viento aumenta la deriva de los mismos y la penetración en la vegetación (Bonds 2012)

Diámetro de gota (µm)	Distancia (m) recorrida en función de la velocidad del viento (Km/h)		
	6.4	3.2	1.6
2.5	9817	4908	2454
10	575	288	144
25	100	50	25

Tabla 3: Distancia recorrida por gotas liberadas a 1,3 metros de altura (Bonds 2012).

1.2.2.3 Verificación de eficacia

Para determinar la eficacia de los tratamientos ULV según la OMS (OMS 2003) se pueden utilizar dos métodos (aunque una combinación de ambos sería ideal): midiendo secuencialmente las variaciones de la densidad de población pre- y post-tratamiento, o evaluando en tiempo real la mortalidad registrada en mosquitos enjaulados. La mortalidad de los mosquitos enjaulados puede estar influida además por el diseño de la jaula, el material con que está realizada, la luz de la malla y su disposición respecto a la dirección del viento. (Boobar et al. 1988; Barber et al., 2006; Hoffmann et al., 2008; Fritz et al., 2010; Bonds et al., 2010). El método del estudio de las densidades pre y post aplicaciones por su parte, es altamente sensible a las variaciones naturales de la población de *Ae. albopictus* así como de su distribución heterogénea, por lo que requiere un muestreo muy bien diseñado.

La metodología de la OMS (OMS 2009) para exponer mosquitos enjaulados es la seguida en el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis (Foto 2), y ha sido empleada también por otros autores para determinar la eficacia de todo tipo de tratamientos adulticidas volumétricos frente a *Ae. albopictus* (Arredondo-Jiménez y Rivero 2006; Suman et al., 2012; Farajollahi y Williams 2013; Faraji et al., 2016). Esta metodología tiene como objetivo determinar la distancia a la que el adulticida es eficaz, mediante el contacto directo con mosquitos.

Dado que el insecticida que forma las nubes de los tratamientos ULV acaba depositándose en la vegetación, hemos considerado interesante determinar si éste causaría una mortalidad secundaria significativa, prolongando así la eficacia de estos tratamientos. Para ello, en el artículo 4.1 se ha empleado la técnica de la exposición foliar descrita por Madden et al. (1947), determinando la mortalidad que causa la vegetación 5 horas después de haber sido tratada por ULV.



Foto 2: Armazón en forma de T usado en el artículo 4.1. de la presente memoria de tesis donde se colgaban a 1,5 m las jaulas de los mosquitos y en la base una planta para medir la persistencia del tratamiento.

La verificación de la eficacia de los tratamientos adulticidas debería de ser un aspecto ineludible en el diseño de programas de actuación frente a *Ae. albopictus*, ya que siguiendo unas medidas de calidad se podrán mejorar la eficacia de las intervenciones (Fernandez-Salas et al., 2015).

1.2.3 Tratamientos residuales por impregnación

Junto con los tratamientos volumétricos, la impregnación de superficies es el otro método de aplicación de adulticidas para el control químico de mosquitos. Ha sido ampliamente utilizado, y es la principal herramienta de control químico en la lucha frente a mosquitos del género *Anopheles*, impregnando superficies intradomiciliarias en áreas donde la malaria es endémica (OMS 2001). Quizás la lucha antipalúdica en España y en el Mediterráneo, donde se realizaban impregnaciones de viviendas con DDT, contribuyó al declive de *Ae. aegypti* de Europa (OMS 2006b), ya que ambos mosquitos intradomiciliarios comparten lugares de descanso similares. Sin embargo la impregnación del interior de las viviendas con insecticidas acarrea muchos problemas toxicológicos al quedar las personas expuestas largo tiempo, por lo que ha de ser aplicada con precaución (OMS 2011b). Del mismo modo, la exposición prolongada a concentraciones decrecientes en el tiempo favorece la selección de mosquitos resistentes.

El factor más importante a la hora de realizar una impregnación es aplicar el producto en aquellas zonas en las que los mosquitos diana descansen o a las cuales tengan que acudir en algún momento de su ciclo biológico. Aplicar los insecticidas en zonas donde el mosquito no se encuentra habitualmente es por supuesto una causa de ineficiencia, como por ejemplo aplicar insecticida en el interior de las viviendas frente a *Ae. albopictus* (Rozilawati et al., 2005).

Los tratamientos de impregnación buscan una mortalidad prolongada en el tiempo, es decir, la persistencia de su efectividad. El objetivo no es buscar únicamente un efecto de choque sino principalmente una mortalidad secundaria. La persistencia de un producto condiciona la cantidad de aplicaciones necesarias a lo largo de la temporada de mosquitos, pero debe mantenerse una toxicidad elevada en la superficie tratada para evitar la aparición de resistencias, que son seleccionadas por dosis sub-letales. Las condiciones ambientales que inciden en la vegetación degradando los biocidas son más extremas que las que afectan al interior de las viviendas (radiación UV y lixiviado por lluvia principalmente) (Allan et al., 2009), por lo que las persistencias obtenidas en el exterior pueden ser muy diferentes a las esperadas en el interior (Tabla 4).

A nivel de materias activas, los primeros Piretroides eran altamente foto lábiles, con lo cual los tratamientos debían de ser nocturnos y sin efecto residual, mientras que las nuevas generaciones son mucho más resistentes a la radiación UV, permitiendo realizar tratamientos diurnos y persistentes (Elliott et al., 1973). Aún así, los insecticidas Piretroides depositados en el haz de las hojas pierden más rápidamente su eficacia que los depositados en el envés, ya que al estar protegidos de las radiaciones solares aguantarán durante más tiempo. Esta misma diferencia ocurre con el lavado (lixiviado) al llover o regar la vegetación, quedando más protegido otra vez el insecticida que se ha depositado en el envés foliar.

Materia activa	Familia	Dosis (g ma/m ²)	Modo de acción	Persistencia efectiva (meses)
DDT	Organoclorado	1-2	contacto	>6
Malatión	Organofosforado	2	contacto	2-3
Fenitrotión	Organofosforado	2	contacto y aéreo	3-6
Pirimifos-metil	Organofosforado	1	contacto y aéreo	2-6
Bendiocarb	Carbamatos	0,1-0,4	contacto y aéreo	2-6
Propoxur	Carbamatos	1-2	contacto y aéreo	3-6
Alfa-cipermetrina	Piretroides	0,02-0,03	contacto	4-6
Bifentrina	Piretroides	0,025-0,05	contacto	3-6
Ciflutrina	Piretroides	0,02-0,05	contacto	3-6
Deltametrina	Piretroides	0,02-0,025	contacto	3-6
Etofenprox	Piretroides	0,1-0,3	contacto	3-6
Lambda-cialotrina	Piretroides	0,02-0,03	contacto	3-6

Tabla 4: Insecticidas recomendados por la OMS para tratamientos residuales en interior frente a vectores de malaria. (http://www.who.int/whopes/Insecticides_IRS_2_March_2015.pdf?ua=1)

A nivel toxicológico la impregnación de vegetación conlleva riesgos menores al estar el insecticida localizado en la zona tratada, sin riesgo de afectar otras zonas por la deriva que es propia de los tratamientos ULV. Pero las concentraciones de insecticida en las plantas una vez tratadas son muy superiores a las que se dan tras las aplicaciones ULV. Usando como ejemplo la Deltametrina, producto usado tanto en el artículo 4.1 como 4.2 de la presente memoria de tesis, en tratamientos ULV la OMS recomienda 1 g de materia activa/hectárea (0,0001 g/m²), mientras que para tratamientos de impregnación la recomendación es de 0,0102 g de Deltametrina/m², es decir, 100 veces más cantidad de materia activa por metro cuadrado impregnando que en tratamientos ULV.

Al impregnar la vegetación es recomendable evitar las flores, reduciendo así los riesgos de afectar a otras especies de insectos no diana. Al no existir deriva, el insecticida no afecta a otras zonas susceptibles como las masas de agua, lo cual debe ser tenido muy en cuenta ya que los Piretroides afectan en gran medida a la fauna acuícola (Antwi y Reddy 2015). Para evitar acumulaciones de insecticida en el suelo, es importante que la aplicación de insecticidas sobre la vegetación no llegue al punto de gotear desde las hojas por una excesiva cantidad (punto de *run-off*). Por estas particularidades el tratamiento de impregnación entraña menos riesgos ecotoxicológicos que los tratamientos ULV, aunque aumenta la posibilidad de seleccionar poblaciones resistentes por la presión continua. También aquí deberá tenerse en cuenta el efecto repelente de los Piretroides, que puede reducir la exposición de los mosquitos a la materia activa, haciendo que se refugien en vegetación no tratada antes que provocarles una mortalidad.

Además de la persistencia de estos tratamientos, la mortalidad directa de los mosquitos mientras se realiza la aplicación es muy alta debido a la preferencia de los mosquitos a descansar en la vegetación. Las máquinas que producen tamaños de partícula grandes (>200 µm) y tienen un potente chorro de aire en la boquilla (30m/s) son idóneas para que el producto penetre en vegetación densa (Hoffmann et al., 2009). El aire generado hace que la vegetación se agite y se mueva, exponiendo el envés de las hojas al tratamiento, además de permitir a las gotas de insecticidas impregnar el micro-hábitat del interior de la planta.

Las ventajas descritas de los tratamientos de impregnación de la vegetación (persistencia, eficacia directa, operatividad y riesgos toxicológicos y ecotoxicológicos) sugieren que éste es un método válido en la aplicación de adulticidas para el control químico de *Ae. albopictus*, sin olvidar nunca que estamos dentro de un sistema de control integrado de vectores (punto 1.1). Pese a ello, esta metodología no ha sido muy estudiada sobre *Ae. albopictus*, por lo que es relevante el artículo 4.2 de la presente memoria de tesis. En él se compararon dos formulaciones de la misma materia activa, y se verificó la persistencia del tratamiento durante varias semanas en condiciones de laboratorio tras tratar una vegetación estándar.

El método más común para determinar la mortalidad causada por la vegetación tratada es mediante bioensayos de exposición foliar (*excised leaf bioassay*) (Madden et al., 1947; Cilek y Hallmon 2006; Xue et al., 2006; Doyle et al., 2009). Sin embargo, en nuestro caso para valorar el efecto repelente que podría tener la planta tratada, los mosquitos fueron expuestos a la planta entera dentro de jaulas (Foto 3), intentando reproducir a nuestro entender las condiciones reales (ensayo de semi-campo). Al realizarse el ensayo en condiciones controladas, con las plantas mantenidas en el interior de un edificio, los insecticidas no fueron degradados por una luz UV directa ni por el lixiviado.



Foto 3: *Hedera hélix* tratada en el artículo 4.2 de la presente memoria de tesis, e introducida en una jaula donde se determinará la mortalidad causada a lo largo del tiempo.

1.2.3.1 Diseño tratamientos impregnación.

A la hora de planificar un tratamiento de impregnación con adulticidas, se pueden optar por dos coberturas: total (realizando tratamientos perimetrales a toda la zona a proteger), o parcial (tratando únicamente algunas áreas interiores conocidas como puntos calientes o *Hot spots*).

Los tratamientos perimetrales, también conocidos como tratamientos barrera, consisten en la aplicación de un adulticida químico en la vegetación periférica de la zona a controlar (Perich et al., 1993). Esta estrategia puede ser muy útil en entornos urbanos y peri-urbanos donde las zonas ajardinadas suelen estar delimitadas por vegetación normalmente arbustiva. Mediante estos tratamientos se logra que esta vegetación sea letal para los mosquitos que se posen en ella (Amoo et al., 2008, Cilek y Hallmon 2006, 2008, Britch et al., 2009). Si la masa vegetal rodea completamente la zona a controlar se consigue que los mosquitos no sean capaces de traspasarla, llegando a tener una zona libre de mosquitos pese a que en el exterior la población pueda ser elevada. El efecto repelente de los Piretroides (Chareonviriyaphap et al., 2004; Kongmee et al., 2004) puede ejercer también un efecto disuasorio para que los mosquitos no traspasen esta barrera. Los tratamientos perimetrales son ideales para proteger frente a *Ae. albopictus* pequeñas parcelas de terreno a un coste reducido.

La definición de *Hot spot* es arbitraria, aunque se considera aquella zona donde existe una concentración de adultos superior al resto de las zonas muestreadas. Para Unlu et al. (2016), una trampa BG Sentinel que recoja más de 5 hembras en un día define una zona como *Hot spot*, mientras que Manica et al. (2016b) lo identifica con pequeñas islas verdes en zonas urbanas. Según estos autores y según observaciones personales, los *Hot spots* suelen ser zonas con vegetación densa, donde no penetren las corrientes de aire, localizadas en áreas húmedas y sombrías con algún lugar de cría cercano o incluso entre la vegetación. En estos micro-hábitats se dan las condiciones idóneas para que los mosquitos se reproduzcan y puedan descansar. Los tratamientos de *Hot Spot* por lo tanto se centran más selectivamente en aquella vegetación sobre la que realmente descansan adultos de *Ae. albopictus* (ver 1.2.1.3 de la presente memoria de tesis) Últimamente este tipo de tratamientos están siendo más estudiados al adaptarse mejor a la biología de *Ae. albopictus* (Marini et al., 2015).

1.3 Resistencia a Insecticidas.

La OMS define la resistencia a insecticidas como la capacidad de una población de insectos de tolerar dosis de un insecticida que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie siendo el resultado de la presión de selección positiva ejercida por el insecticida (OMS 1975). Conocer el estado de las susceptibilidades en la población de *Ae. albopictus* a controlar es importante para el correcto diseño de cualquier campaña de control. En algunos brotes epidémicos en los que *Ae. aegypti* actuaba como vector, la presencia de poblaciones resistentes podría haber sido un factor clave en el bajo éxito de las campañas de control (Marcombe et al., 2009; Dusfour et al., 2011; Macoris et al., 2014).

La aparición de resistencias a insecticidas en mosquitos ha sido una constante en todo el planeta. Su uso indiscriminado, mediante métodos de aplicación inapropiados y sin controles de calidad ha disparado el número de resistencias generadas. En el caso de la lucha frente a la Malaria, los tratamientos residuales en el interior de las viviendas ha seleccionado a lo largo del tiempo poblaciones de *Anopheles s.p.* altamente resistentes a insecticidas (DDT y Piretroides principalmente). Este mismo camino ha seguido *Ae. aegypti* en Sudamérica principalmente, como se ha expuesto en el artículo 4.4 de la presente memoria de tesis.

Existen principalmente dos métodos para determinar la resistencia a insecticidas de una población de mosquitos mediante bioensayos, es decir, exponiendo directamente individuos adultos a los insecticidas: la descrita por la OMS mediante tubos interconectados (descrita en el punto 1.3.1 y empleada en el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis) y la descrita por el CDC, mediante botellas impregnadas. En una población de mosquitos cada individuo tiene una tolerancia diferente a los insecticidas, por lo que en un bioensayo se busca conocer el porcentaje de mosquitos que son sensibles al mismo. Ante una población resistente a un insecticida se pueden realizar además bioensayos con materias activas sinérgicas (como el Pbo) o determinar los mecanismos enzimáticos o moleculares que intervienen (Figura 3).

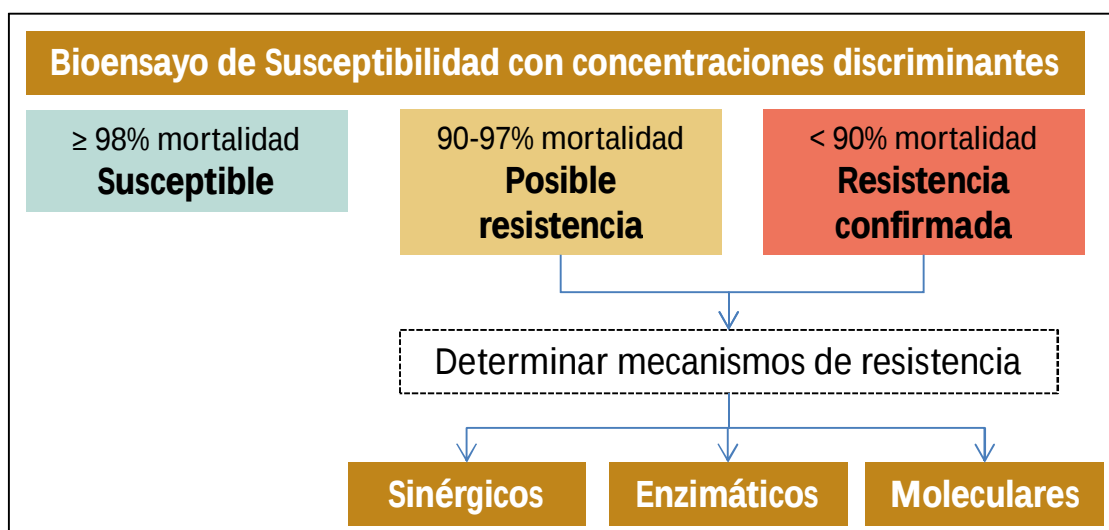


Figura 3: Criterios de resistencias determinados por la OMS y los mecanismos a estudiar. (OMS 2016).

Los mosquitos pueden ver alterada su sensibilidad frente a los insecticidas mediante dos mecanismos: incrementando la producción metabólica de enzimas detoxificantes (estudiada mediante ensayos enzimáticos), o bien procurando la insensibilidad de los receptores diana (estudiada mediante ensayos moleculares) (Nauen, 2007; Whalon et al., 2008). La detoxificación consiste en la transformación de sustancias tóxicas de origen externo o interno en compuestos hidrosolubles que puedan ser excretados. Las enzimas detoxificantes implicadas son esterasas, citocromo P450 oxidasas y glutathione-S-transferasas, proporcionando una resistencia metabólica (Hemingway et al., 2004; Hemingway et al., 1998; Ranson y Hemingway 2005). En el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis se han realizado ensayos enzimáticos únicamente. Hay que mencionar que los elementos diana atacados por los insecticidas son neurotransmisores como la acetilcolinesterasa en la sinapsis nerviosa, el ácido aminobutírico (GABA) y el canal de sodio, los cuales están regulados por los genes *ace1*, *Rdj* y *kdr* respectivamente (Brenques et al., 2003; Tantely et al., 2010; Raymond et al., 2001). Las mutaciones en estos genes, identificables mediante los ensayos moleculares, pueden modificar la estructura y funcionamiento de estos sistemas y alterar así la sensibilidad a los insecticidas.

Conociendo los mecanismos de resistencia implicados en cada caso se podrán tomar medidas para mitigarlos, como adoptar familias de insecticidas que no tengan el mismo sistema de acción o las mismas rutas metabólicas. Por desgracia, como se expone en el artículo 4.4 de la presente memoria de tesis, el abanico de familias de materias activas es muy reducido, centrándose principalmente en Piretroides (Tabla 9).

La bibliografía sobre las resistencias a insecticidas de *Ae. albopictus* no es tan extensa como la de *Ae. aegypti*. Se encuentra resumida en Ranson et al. (2010) (publicaciones hasta 2008) y en Vontas et al. (2012) (publicaciones de 2008 a 2012). La base de datos usada por Ranson, IR base, ha sido renombrada en Febrero de 2015 a "Population Biology", accesible desde www.vectorbase.org (Figura 5 y 6). Además de estas 2 revisiones se han publicado varios trabajos sobre la resistencia de *Ae. albopictus* frente a diferentes insecticidas hasta la fecha (Tabla 5: Piretroides; Tabla 6: Otros). Es de especial importancia el estudio realizado en el Baix Llobregat por Huijben et al. (2017), que junto al estudio realizado en el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis son los únicos estudios de resistencia frente a *Ae. albopictus* realizados en España. El uso de los tubos de la OMS es la metodología más extendida para determinar la resistencia de *Ae. albopictus* en las publicaciones que se han encontrado sobre su estatus de resistencia (Jirakanjanakit et al., 2007; Ranson et al., 2010; Chan et al., 2011; Vontas et al., 2012; Lee et al., 2014; Thanispong et al., 2015; Boudibi et al., 2016). Por lo tanto ha sido la metodología empleada en el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis.

Active Ingredient	Country	Status	Author
Deltamethrin	India	Moderate	Kushwah et al., 2015
		Susceptible	Chakraborti et al., 1993
			Sharma, Saxena y Lal 2004
			Dhiman et al., 2014
			Das y Dutta 2014
			Kushwah et al., 2015
			Sivan et al., 2015
			Yadav et al., 2015
			Chatterjee et al., 2017
			Bharati y Saha 2017
	Malaysia	Moderate	Ishak et al., 2015
		Susceptible	Chan, Mustafa y Zairi 2011
			Chen et al., 2013
			Ishak et al., 2015
			Rahim et al., 2017b
	China	Resistant	Cui, Raymond y Qiao 2006
			Chen et al., 2016
			Li et al., 2018
	Italy	Susceptible	Neng et al., 1992
		Susceptible	Romi et al., 2003
			Vontas et al., 2012
	Thailand	Resistant, Moderate and Susceptible	Pichler et al., 2017
			Jirakanjanakit et al., 2007
	USA	Resistant	Thansipong et al., 2015
			Liu et al., 2004
	Pakistan	Susceptible	Marcombe et al., 2014
			Khan et al., 2011
	Cameroon	Resistant	Mohsin et al., 2016
			Moderate
	Greece	Resistant and Moderate	Arslan et al., 2016
			Kamgang et al., 2011;
	Spain	Susceptible	Kamgang et al., 2017
	Brasil	Possible Resistance	Vontas et al., 2012
	Haiti	Susceptible	Huijben et al., 2017
Permethrin	Thailand	Susceptible	Santos, 2017
			McAllister, Godsey y Scott 2012
			Somboon, Prapanthadara y Suwonkerd 2003
			Ponlawat, Scott y Harrington 2005
		Resistant	Jirakanjanakit et al., 2007
			Chuaycharoensuk et al., 2011
	Malaysia	Resistant	Chuaycharoensuk et al., 2011
			Thanispong et al., 2015
		Susceptible	Chan, Mustafa y Zairi 2011
			Chen et al., 2013
		Resistant	Wan-Norafikah et al., 2008
			Wan-Norafikah et al., 2013
			Ishak et al., 2015

Continúa



	India	Susceptible	Sharma, Saxena y Lal 2004
		Resistant	Kushwah et al., 2015
			Sivan et al., 2015
	USA	Susceptible	Liu et al., 2004
			Alimi et al., 2013
			Sun et al., 2014
	China	Moderate	Neng et al., 1992
		Resistant	Chen et al., 2016
	Italy	Susceptible	Romi et al., 2003
			Suter et al., 2017
		Resistant	Pichler et al., 2017
	Sri Lanka	Susceptible	Dharshini et al., 2011
		Resistant	Karunaratne et al., 2013
	Pakistan	Resistant	Arsan et al., 2016
			Mohsin et al., 2016
	Haiti	Susceptible	McAllister, Godsey y Scott 2012
	Cameroon	Susceptible	Kamgang et al., 2017
	Geece	Moderate	Pichler et al., 2017
	Switzerland	Susceptible	Suter et al., 2017
Lambda-Cyhalothrin	India	Susceptible	Sharma, Saxena y Lal 2004
			Bharati y Saha 2017
		Resistant	Sivan et al., 2015
	China	Susceptible	Chen et al., 2016
	Pakistan	Resistant	Mohsin et al., 2016
		Moderate	Arsan et al., 2016
	Malaysia	Resistant	Abu Hasan et al., 2016
	Italy	Susceptible	Suter et al., 2017
	Switzerland	Susceptible	Suter et al., 2017
Cypermethrin	Pakistan	Moderate (larvae)	Khan et al., 2011
	Singapore	Resistant	Lee et al., 2014
	Thailand	Resistant	Thanispong et al., 2015
Cyfluthrin	China	Susceptible	Chen et al., 2016
	India	Resistant	Sivan et al., 2015
Bifenthrin	Thailand	Resistant, Moderate and Susceptible	Thanispong et al., 2015
Alpha-Cypermethrin	Thailand	Resistant	Thanispong et al., 2015
	Italy	Resistant, Moderate and Susceptible	Pichler et al., 2017
	Albania	Susceptible	Pichler et al., 2017
Beta-Cypermethrin	China	Resistant	Chen et al., 2016
Etofenprox	China	Susceptible	Chen et al., 2016
Fenothrin	USA	Susceptible	Marcombe et al., 2014
Pralethrin	USA	Susceptible	Marcombe et al., 2014
Tetramethrin	China	Susceptible	Chen et al., 2016

Tabla 5: Datos publicados sobre la susceptibilidad de *Ae. albopictus* frente a Piretroides

Active Ingredient	Country	Status	Author
DDT	China	Resistant	Neng et al., 1992
			Cui, Raymond y Qiao 2006
			Li et al., 2018
	Sri Lanka	Resistant	Karunaratne et al., 2013
	Thailand	Resistant	Somboon, Prapanthadara y Suwonkerd, 2003
	India	Resistant	Sharma, Saxena y Lal 2004
			Dhiman et al., 2014
			Das and Dutta 2014
			Yadav et al., 2015
			Sivan et al., 2015
			Kushwah et al., 2015
			Chatterjee et al., 2017
	Cameroon	Resistant	Kamgang et al., 2011
			Kamgang et al., 2017
	Pakistan	Resistant	Arsan et al., 2016
			Mohsin et al., 2016
	Malaysia	Resistant	Ishak et al., 2015
			Rahim et al 2017b
	USA	Resistant	Marcombe et al., 2014
	Spain	Susceptible	Huijben et al., 2017
	Italy	Susceptible	Suter et al., 2017
	Switzerland	Susceptible	Suter et al., 2017
Temephos	Malaysia	Resistant (larvae)	Chen et al., 2005
			Hamdan et al., 2005
			Chan, Mustafa y Zairi 2011
			Rahim et al., 2017a
	China	Resistant (larvae)	Neng et al., 1992
	Italy	Resistant (larvae)	Romi et al., 2003
			Vontas et al., 2012
	Greece	Resistant (larvae)	Vontas et al., 2012
Malathion	USA	Resistant	Wesson 1990
			Ali, Nayar y Xue 1995
			Khoo et al., 1988
			Marcombe et al., 2014
	Malaysia	Resistant	Ishak et al., 2015
			Rahim et al 2017b
	Pakistan	Resistant	Arsan et al., 2016
	India	Susceptible	Chatterjee et al., 2017
			Bharati y Saha 2017
	China	Susceptible	Li et al., 2018
	Italy	Susceptible	Suter et al., 2017
	Switzerland	Susceptible	Suter et al., 2017

Continúa



Bendiocarb	India	Resistant	Sivan et al., 2015
	Malaysia	Resistant	Chen et al., 2013
			Ishak et al., 2015
	Pakistan	Resistant	Arslan et al., 2016
	Italy	Susceptible	Suter et al., 2017
	Switzerland	Susceptible	Suter et al., 2017
	Spain	Susceptible	Huijben et al., 2017
Fenitrothion	India	Resistant	Sivan et al., 2015
	Malaysia	Resistant	Chen et al., 2013
Propoxur	Malaysia	Resistant	Chen et al., 2013
			Ishak et al., 2015
	China	Resistant	Li et al., 2018
Clorpiriphos	USA	Resistant (larvae)	Liu et al., 2004
Dieldrin	Malaysia	Resistant	Ishak et al., 2015
Pirimiphosmetil	Malaysia	Susceptible	Abu Hasan et al., 2016
	Spain	Resistant	Huijben et al., 2017

Tabla 6: Datos publicados sobre la susceptibilidad de *Ae. albopictus* frente a otros insecticidas.

1.3.1 Bioensayo Tubo OMS.

El ensayo de susceptibilidad de la OMS es una respuesta directa a la exposición de un mosquito frente a una concentración conocida de insecticida. Esta técnica está publicada repetidas veces en documentación de la OMS, siendo la más reciente la segunda edición de: “Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes”, de Noviembre de 2016. Para llevar a cabo este ensayo se emplean unos tubos suministrados a través de la propia OMS.

El principio de este método es comparar la mortalidad causada por una concentración conocida de insecticida a una población a evaluar con la causada a una población susceptible. Sobre esta última se calcula la concentración discriminante, que será posteriormente usada frente a las poblaciones de campo. Por ello, el procedimiento del ensayo varía ligeramente según el tipo de dato que se quiera obtener (concentración discriminante o la mortalidad de una población).

Las concentraciones discriminantes permiten realizar una evaluación rápida de la resistencia de una población de mosquitos a un insecticida concreto sin necesidad de fijar continuamente un patrón. Estas concentraciones son prefijadas por organizaciones globales como la OMS, aunque también pueden ser establecidas en cada territorio para adaptarse mejor a las poblaciones existentes. En la segunda edición del “Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes” de la OMS se recomiendan unas concentraciones para aedinos (Tabla 7).

Insecticide class	Insecticide	Discriminating concentrations (%)	Exposure period (hours)
Pyrethroids	Alpha-cypermethrin	0.03 ^a	1
	Cyfluthrin	0.15 ^b	1
	Deltamethrin	0.03 ^a	1
	Etofenprox	0.5 ^b	1
	Lambdacyhalothrin	0.03	1
	Permethrin	0.25	1
Organophosphate	Fenitrothion	1	1
	Malathion	0.8	1
	Pirimiphos methyl	0.21 ^b	1

^a Tentative

^b Determined for *Anopheles* mosquitoes, tentative for *Aedes*.

Tabla 7: Concentraciones discriminantes para mosquitos *Aedes* pendientes de confirmar (OMS 2016).

La OMS asume dos posibles criterios para el cálculo de las concentraciones discriminantes mediante dos criterios: el doble de la concentración más baja que obtiene una mortalidad del 100% sobre la población susceptible o el doble del valor de la LC₉₉ (concentración letal que mata al 99% de los mosquitos susceptibles). Para el artículo 4.3 se empleó el primer criterio para fijar nuestras concentraciones discriminantes. También se calcularon las LC₉₉ de cada insecticida para poder comparar los resultados.

1.3.2 Ensayos Enzimáticos

Los insecticidas Piretroides son agentes externos contaminantes que actúan sobre el sistema nervioso, que pueden ser neutralizados por las enzimas esterasas, citocromo P450 oxidadas y glutathione-S-transferasas antes de que lleguen a penetrar o actuar en todo el organismo, teniendo como diana los neurotransmisores. El uso de ensayos enzimáticos para la detección de resistencias a niveles fisiológicos puede proporcionar una herramienta muy poderosa para analizar poblaciones de campo. Al detectar enzimas sobre expresadas se puede optar por materias activas que no se vean afectadas por estas enzimas, pudiendo elegir así insecticidas eficaces frente a estas poblaciones (Brogdon y McAllister 1998), aunque la relación no es inmediata, ya que estos enzimas intervienen en la detoxificación de muchas otras sustancias tóxicas presentes en el medio urbano.

La metodología para realizar los ensayos enzimáticos viene explicada en la guía de la OMS “Techniques to detect insecticide resistance mechanisms”(WHO 2013), y en la guía del Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4) “Methods in Anopheles research” (MR4 2007). Ambos métodos utilizan la espectrofotometría como medición de las actividades enzimáticas, comparando los datos de una población susceptible (generalmente de laboratorio) con otra sospechosa (generalmente de campo).

Para medir los valores enzimáticos primeramente hay que conocer la cantidad total de proteína en cada mosquito. Esto se realiza mediante una recta patrón con cantidades conocidas de proteínas sobre las que se corregirán las actividades enzimáticas (Foto 4).

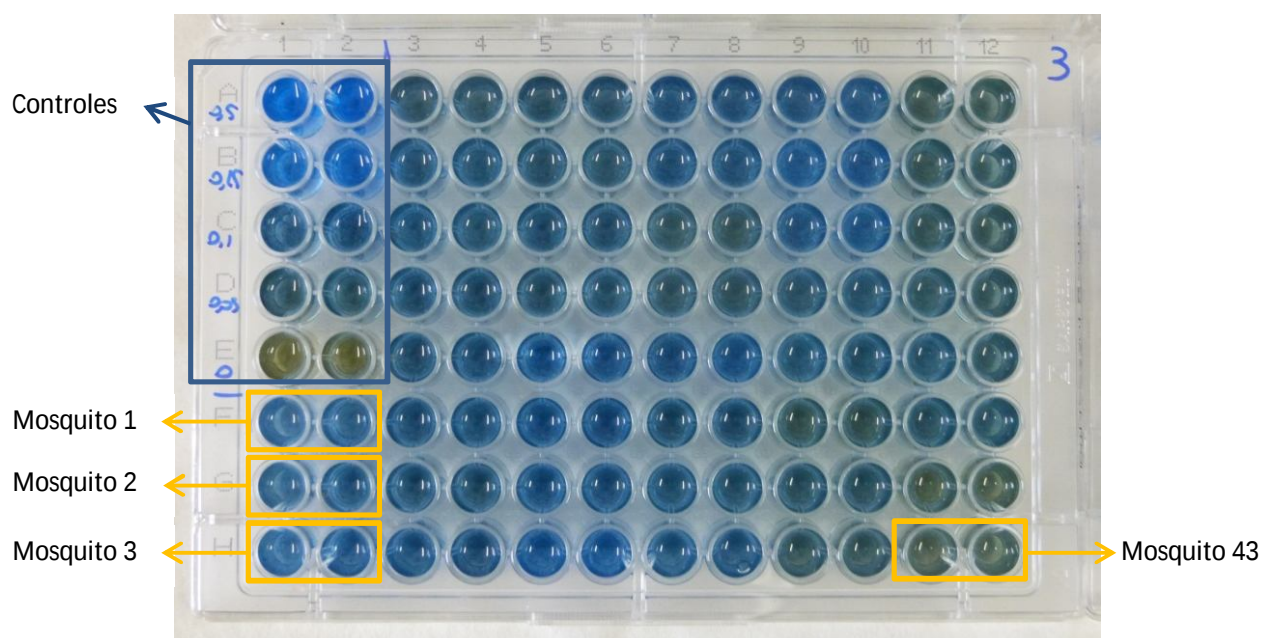


Foto 4: Microplaca con ensayo de proteína total, donde se aprecia a simple vista las diferencias de coloración lo que indica diferentes cantidades de proteínas en cada mosquito.

Las enzimas estudiadas han sido:

- **Esterasas Inespecíficas:** Catalizan reacciones de hidrólisis de ésteres carboxílicos entre otros, como los organofosforados, que actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa, con lo cual se acumula el neurotransmisor acetilcolina lo que provoca la sobre-estimulación del sistema nervioso, y finalmente la muerte. (Hemingway et al., 2004).
- **Citocromo P450 oxidasas:** Las monooxigenasas dependientes del Citocromo P450 con un pigmento que absorbe luz a una longitud de onda de 450 nanómetros (de ahí su nombre), son una diversa familia de enzimas hidrofóbicas involucradas en el metabolismo de numerosos compuesto endógenos y exógenos. En muchos estudios, como indica la revisión de Hemingway et al. (2004), se han encontrado elevadas actividades de Citocromo P450 monooxigenasas en mosquitos resistentes, en combinación generalmente con una actividad alterada de otras enzimas.
- **Glutation S-transferasas:** Las glutatión S-transferasas (GST) actúan como enzimas desintoxicantes, conjugando el glutatión a productos del metabolismo propio de las células o a agentes xenobióticos. Esta unión aumenta su solubilidad y ayuda a su excreción desde la célula (Kostaropoulos et al., 2001). Estas enzimas desempeñan un papel importante en la protección de las células a los efectos nocivos del estrés oxidativo, las vías de señalización celular, el transporte intracelular y varias vías biosintéticas. Las GST pueden catalizar la detoxificación de varias clases de insecticidas, como la conjugación del glutatión con insecticidas organofosforados, y la deshidrocloración de insecticidas organoclorados como el DDT (Clark y Shamaan, 1984). La GST, junto con actividad de la peroxidasa, también puede conferir protección frente a los efectos secundarios de la exposición a insecticidas como el estrés oxidativo (Vontas et al., 2001). La actividad elevada de GST puede ser por tanto un importante mecanismo por el cual los insectos desarrollan resistencia a los insecticidas. En los mosquitos, la mayoría de las investigaciones se han centrado en el papel de los GST en la resistencia al DDT (Ranson y Hemingway 2005).

1.3.3. Resistencias en *Ae. aegypti*

Además del problema de la presencia de *Ae. albopictus* en España, hay varias especies de mosquitos exóticos que también podrían establecerse en la península ibérica como por ejemplo *Ae. aegypti*, *Ae. atropalpus*, *Ae. japonicus*, *Ae. koreicus* o *Ae. triseriatus* (ECDC 2012). Es especialmente relevante una posible introducción de *Ae. aegypti*, ya que es el vector principal de varias enfermedades arbovíricas como Chikungunya, Dengue 1-4, Encefalitis equina del este, Encefalitis La Crosse, Fiebre del valle del Rift, Fiebre Amarilla y Zika (ECDC 2010; Wong et al., 2013). *Ae. aegypti* era un mosquito común en el arco mediterráneo hasta mediados del siglo XIX, cuando desapareció de la península ibérica probablemente por la acumulación de varios factores como la lucha antipalúdica, el incremento de la salubridad en las ciudades, y el fin de su introducción continua en barcos (Eritja et al., 2005).

El estatus de la susceptibilidad de *Ae. aegypti* en sus países de origen viene recogido en el artículo 4.4 de la presente memoria de tesis. Para este trabajo se han definido primeramente los países que tienen presencia de *Ae. aegypti* y que mantienen un comercio intenso con España, siendo los países de América del Sur y Portugal a través de Madeira los posibles emisores (CCAES, 2015). Posteriormente se han analizado publicaciones sobre la resistencia a insecticidas de *Ae. aegypti* en estos países, teniendo como baremo las indicaciones de la OMS (Figura 3). También se ha consultado la base de datos VectorBase (anteriormente citada), donde vienen geolocalizados los estudios de resistencia a insecticida (Figuras 5 y 6). En un gran número de estas referencias se describen tasas muy altas de resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas de manera generalizada en el continente sudamericano así como en Madeira y Cabo Verde (Ribeiro et al., 2015), lo que hace muy probable que los mosquitos que llegasen hasta España no sean susceptibles a algunos insecticidas (resistencias indicadas en la Tabla 1 del artículo 4.4).

Tras comparar revisiones bibliográficas como la de Ranson et al. (2010) o la de Smith et al. (2016), donde vienen reflejadas las resistencias a insecticidas en *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*, resulta obvio el mayor volumen de información que se dispone de esta última especie. Esta diferencia se debe probablemente a la consideración de *Ae. aegypti* como principal vector de arbovirosis, sido estudiado en todos los aspectos en mayor medida que *Ae. albopictus*. En España, como hemos indicado en el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis, existen ya poblaciones resistentes de *Ae. albopictus* (y poblaciones con una resistencia incipiente o posible), lo cual proporciona una útil información a nivel europeo en particular y a nivel global en general, ya que dependiendo del flujo de mosquitos a nivel continental, estas resistencias incipientes podrían desplazarse a otros países.

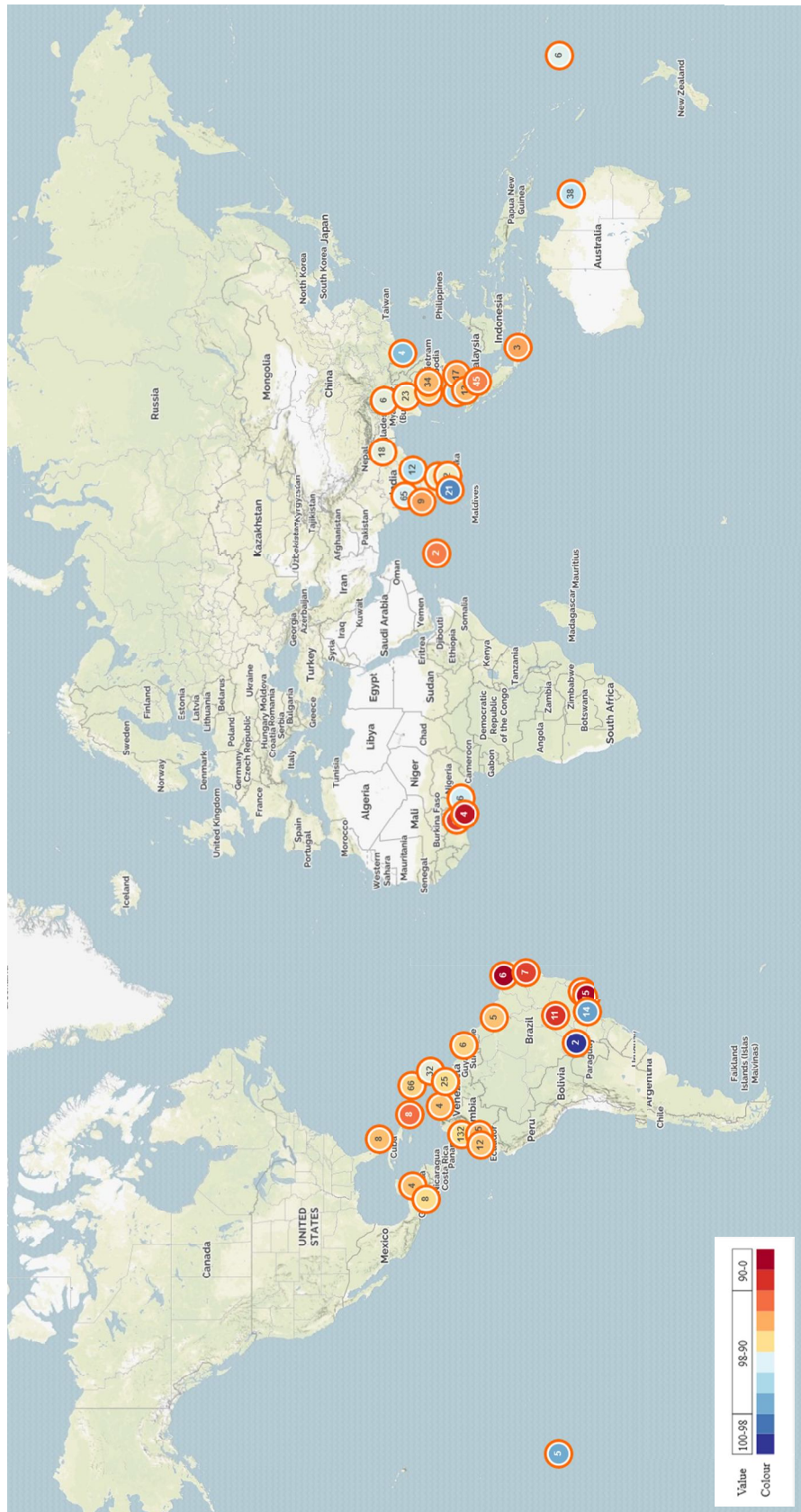


Figura 4: Localización de las resistencias a insecticidas de *Ae. aegypti* registradas en VectorBase. La coloración representa los valores del porcentaje de mortalidad inspirados en el bioensayo del tubo de la OMS. La numeración es el número de cepas de mosquito que han sido testadas en esa zona geográfica. (<https://www.vectorbase.org/popbio/map/?view=ir>)

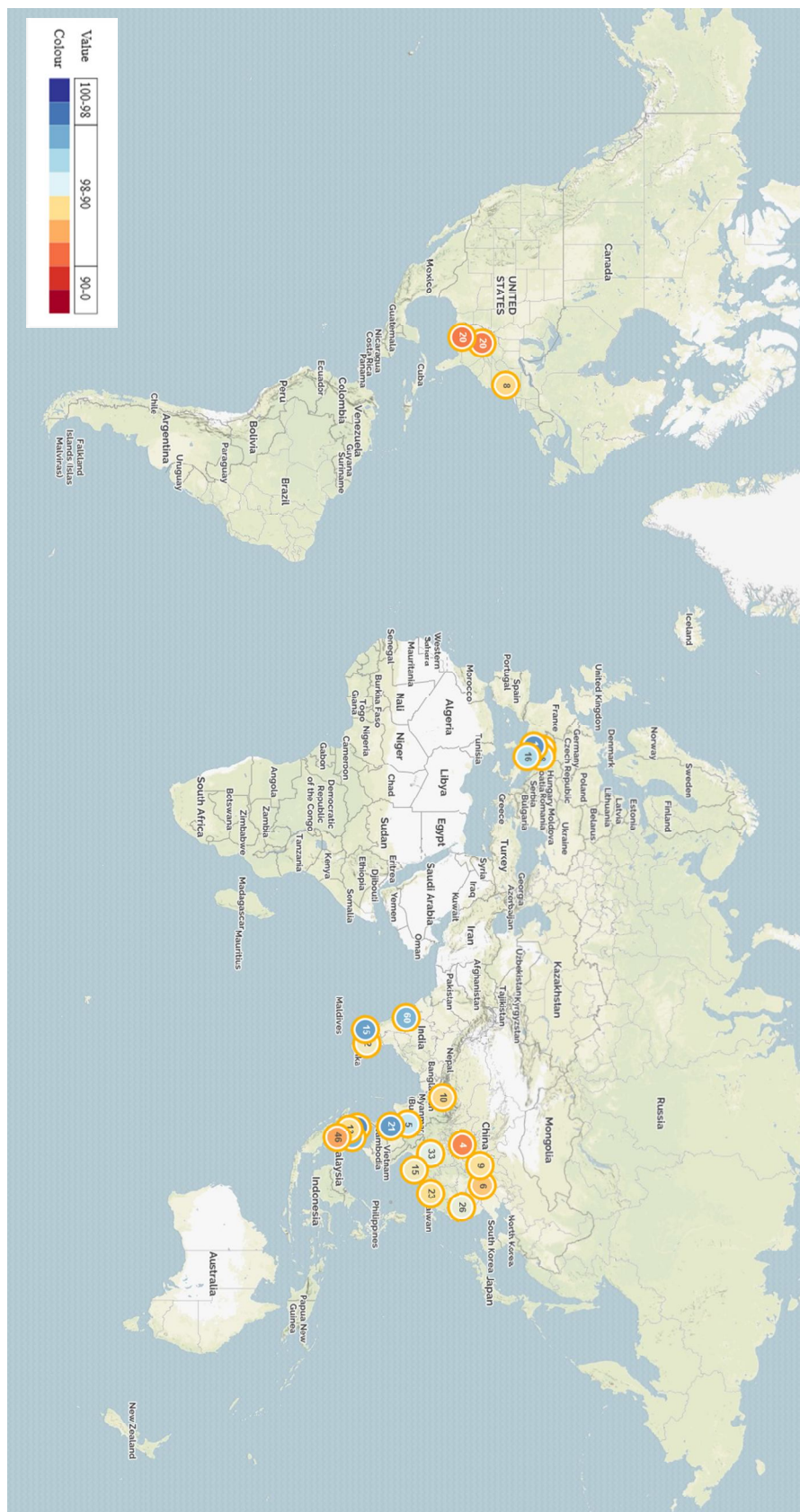


Figura 5: Localización de las resistencias a insecticidas de *Ae. albopictus* registradas en VectorBase. La coloración representa los valores del porcentaje de mortalidad inspirados en el bioensayo del tubo de la OMS. La numeración es el número de cepas de mosquito que han sido testadas en esa zona geográfica. (<https://www.vectorbase.org/popbio/map/?view=ir>)

2. OBJETIVOS

1. Implantar y mantener de una colonia de *Ae. albopictus* en laboratorio para poder obtener los mosquitos necesarios para todos los ensayos a realizar, tanto de tratamientos adulticidas como de resistencia a insecticidas. Puesto que se necesitarán muchos individuos adultos en momentos puntuales, el sistema de cría deberá de estar adaptado a estos picos. También se tendrán que criar otras poblaciones de campo para analizar sus resistencias a insecticidas.
2. Determinar la eficacia de los tratamientos con una maquinaria ULV sobre vehículo empleando un adulticida habitual en el control de *Ae. albopictus* (Aqua K-othrine®). Conocer la distancia a la que un producto es eficaz es de vital importancia para planificar los trayectos por los que el vehículo ha de realizar su recorrido para tratar una zona completa. También es muy importante conocer este dato para determinar la intensidad con la que se ha de realizar una aplicación, ya que su eficacia se ve reducida por la presencia de vegetación y por las condiciones climáticas (viento principalmente). Muchas veces no se dan las condiciones idóneas para realizar un tratamiento, pero la urgencia de tratar una zona (efecto choque en casos de transmisión de enfermedades) junto con la planificación requerida para realizarlos (personal disponible, permisos solicitados, delimitación del área, restricciones en los accesos, etc...) hacen que sea imposible retrasar un tratamiento, por lo que hay que adaptarse a las condiciones de ese momento.
3. Evaluar la persistencia de los insecticidas sobre la vegetación, ya que uno de los métodos de aplicación más comunes es la impregnación de la vegetación perimetral. Al tratar la vegetación, los mosquitos que se refugien en la misma entrarán en contacto con el insecticida, el cual les causará la muerte o repelencia. Con este tipo de tratamientos se busca crear zonas libres de mosquitos durante un largo período de tiempo.
4. Conocer el estado de susceptibilidad de diferentes poblaciones de *Ae. albopictus* en España frente a varios adulticidas y determinar los mecanismos enzimáticos afectados.
5. Valorar las resistencias a insecticidas que pueden acompañar a la reintroducción de nuevas poblaciones de *Ae. albopictus* o de *Ae. aegypti*.
6. Establecer unas recomendaciones de actuación a la hora de realizar tratamientos adulticidas como parte del CIV, las cuales deberían de estar restringidas a brotes epidémicos o aquellas situaciones que la alta densidad poblacional suponga una alarma social.

3. METODOLOGÍA

En cada una de las publicaciones que componen la presente memoria de tesis han empleado una metodología de ensayo diferente, dado que se han determinado diferentes aspectos de la acción de los adulticidas.

En el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis se evaluaron los tratamientos ULV sobre un vehículo. Las aplicaciones de adulticidas fueron llevadas a cabo por el Servei de Control de Mosquitos del Baix Llobregat (SCMBL) en 5 cementerios de municipios de esta comarca y en un gran almacén vacío (95 metros de largo, 35 de ancho y más de 10 metros de alto). La maquinaria empleada fue una Martignani Phantom “Minor B-748”® ajustada para aplicar 50 litros en una hora, lo que de acuerdo con el fabricante se considera ULV (con su boquilla correspondiente). Se compararon 2 adulticidas: Fastac® (10% Alfa-cipermetrina, aplicado a una dosis de 0,83 g IA/ha) y Aqua K-othrine® (2,03% Deltametrina, aplicado a una dosis de 1 g IA/ha). Los tratamientos fueron realizados en condiciones reales de campo, por lo que se anotaron en cada caso las condiciones meteorológicas (mediante una estación meteorológica portátil que registraba temperatura, humedad, dirección del viento y su intensidad). Para determinar la eficacia de los tratamientos adulticidas se realizaron 2 tipos de ensayos: mortalidad directa causada sobre mosquitos enjaulados y mortalidad residual causada por plantas tratadas. También se determinó los tamaños de gota y su densidad a lo largo de la zona tratada.

La mortalidad directa fue calculada según la metodología descrita por la OMS (OMS 2009), exponiendo grupos de 20 hembras de *Ae. albopictus* (de 2 a 5 días de edad adulta) en jaulas centinela de 6,5 cm de diámetro y 26 cm de largo, cubiertas de una malla con una luz de 1mm, y colgadas en unos bastidores a 1,5 m de altura (Foto 2) a la nube de insecticida provocada por el ULV. En cada bastidor se colocaron 3 jaulas centinela (separadas 0,5 m cada una), un arbusto de Boj en la base (el cual será empleado para el ensayo de mortalidad secundaria) y un papel hidrosensible (para observar las gotas de insecticida). Éstos bastidores se dispusieron a 5, 10, 15, 20 y 25 metros de distancia de la boquilla de la maquinaria ULV. Las jaulas centinela se colgaron 15 minutos antes del tratamiento y se retiraron entre 15 y 30 minutos después del mismo, transfiriendo los mosquitos a unos contenedores libres de insecticida. Se contabilizaron los mosquitos abatidos 30 minutos y 1 hora después del tratamiento, así como la mortalidad a las 24 horas (corregidos estos valores con los datos de las 3 jaulas control colocadas fuera de la zona tratada mediante la fórmula de Abbot). El tratamiento estadístico de los resultados consistió primeramente en realizar un análisis de la varianza entre las 3 jaulas centinela de cada distancia, empleando el método de máxima verosimilitud restringida (REML). Posteriormente se realizó un modelo general lineal (GLM) para analizar las diferencias entre las mortalidades obtenidas a diferentes distancias en cada escenario de aplicación (cada uno con el adulticida correspondiente y unas condiciones meteorológicas diferentes). El coeficiente beta del GLM fue también usado para determinar cuál era el factor que más influía en la mortalidad de los tratamientos ULV.

La mortalidad secundaria causada por los tratamientos ULV fue calculada según una modificación de la metodología “bioensayo de hoja cortada”, el cual consiste en exponer grupos de 10 hembras de *Ae. albopictus* a partes de vegetación tratada. 5 horas después del tratamiento se cortaron 3 ramas (con 10 hojas cada una) de cada arbusto de Boj (*Euonymus japonicus*) tratado, las cuales fueron puestas en contacto con los mosquitos en el laboratorio, contabilizándose la mortalidad a las 24 horas. También se empleó un arbusto colocado en el exterior de la zona tratada a modo de control, corrigiendo las mortalidades de los arbustos tratados mediante la fórmula de Abbot. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA de una cola) a cada distancia en cada escenario de aplicación, para determinar en qué condiciones (y con qué formulado) se había logrado la mayor mortalidad secundaria.

En el artículo 4.2 de la presente memoria de tesis se estudió la persistencia de dos tipos de formulado sobre la vegetación. Ambos formulados (K-Othrine SC25® y Aqua K-othrine®) contienen Deltametrina, y fueron aplicados con la misma dosificación (0.0102 g/m²) mediante pulverización (mochila pulverizadora) sobre macetas con hiedra (*Hedera helix*). Se trataron así 3 plantas con cada formulado, además de 3 plantas con agua a modo de control. Cada una de estas 9 plantas fue introducida en una jaula de 30 X 30 X 20 cm, donde los días 5, 12, 19, 27 y 34 después del tratamiento se realizaban ensayos de exposición similares a los “bioensayo de hoja cortada” descritos en el párrafo anterior. En estos ensayos se introducían grupos de 20 hembras de *Ae. albopictus* en las jaulas, las cuales eran retiradas mediante un aspirador a las 24 horas, anotando la mortalidad. La variabilidad de la mortalidad media causada por las plantas tratadas con el mismo producto (y el mismo día) fue analizada mediante un test de Chi-cuadrado. Para determinar las diferencias entre los dos formulados se empleó un análisis de la varianza (ANOVA de 1 cola) en cada día de bioensayo. Dado que los insecticidas piretroides pueden tener un efecto repelente, el motivo de usar una planta entera en una jaula es permitir al mosquito que se pose sobre la jaula en vez de sobre la vegetación tratada, la cual por la protección y humedad que genera tiene un efecto atrayente.

En el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis se ofrecieron los primeros datos sobre la susceptibilidad de *Ae. albopictus* de España a diferentes insecticidas piretroides. Para ello se emplearon tanto bioensayos como ensayos enzimáticos, ambas metodologías descritas por la OMS (OMS 2016) y descritas en los puntos 1.3.1 y 1.3.2 de la presente memoria de tesis. Para determinar la susceptibilidad o resistencia de una población frente a un insecticida, ésta ha de ser comparada con una población cuya susceptibilidad sea conocida (generalmente criada en Laboratorio). En nuestro estudio se empleó la cepa criada en el la Universidad de Zaragoza desde 2010 como población susceptible y se determinó la susceptibilidad de 4 poblaciones recogidas mediante ovitrampas en Octubre de 2013 en Barcelona, Peñíscola, Castellón y Mallorca (con un mínimo de 500 huevos por población).

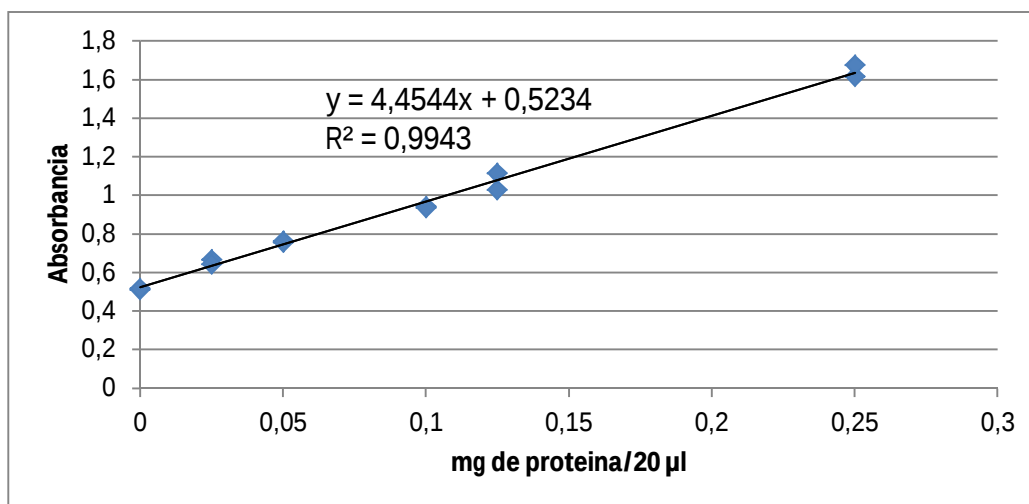
Concentración (%)	0,005	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1
Insecticida (mg)	0,033	0,0825	0,165	0,33	0,66	1,65	3,3	4,95	6,6
mg insecticida /m ²	1,83	4,58	9,17	18,33	36,67	91,67	183,33	275,00	366,67

Tabla 8: Cantidad de insecticida en los papeles impregnados.

Los bioensayos fueron realizados empleándose los tubos del kit oficial de la OMS, mientras que los papeles (de 12 x 15 cm) fueron impregnados en nuestro laboratorio con diferentes cantidades de Deltametrina, Permetrina y Cipermetrina de grado técnico (Tabla 8) disueltos en acetona (2ml por papel) y aceite de silicona (0,66ml por papel). También se prepararon del mismo modo los papeles control, pero sin insecticida. Todos los bioensayos fueron realizados en un laboratorio, a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa de $75 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con hembras de 3 a 5 días de edad. Primeramente se calcularon las concentraciones discriminantes con la población de laboratorio. Cuatro grupos de 25 hembras de *Ae. albopictus* no alimentadas de la cepa de Zaragoza fueron expuestas durante una hora a papeles impregnados con cinco concentraciones progresivas de cada uno de los tres insecticidas. Se determinó el Knock-Down cada 15 minutos para obtener el KDT_{50} (tiempo en el que el 50% de los mosquitos están abatidos) y tras 1 hora de exposición los mosquitos fueron transferidos al tubo sin insecticida donde se calculó el porcentaje de mortalidad a las 24 horas. Otros cuatro grupos de 25 hembras fueron expuestos a un papel sin insecticida a modo de control. El doble de la concentración más baja en obtener una mortalidad del 100% fue fijada como concentración discriminante, aunque el valor de la LC_{99} (concentración letal que mata al 99% de los mosquitos) también fue calculado mediante un análisis probit. Una vez fijada la concentración discriminante, se expusieron 100 mosquitos hembra (4 grupos de 25 individuos no alimentadas con sangre) de cada población de campo (Barcelona, Peñíscola, Castellón y Mallorca) a papeles impregnados con las concentraciones discriminantes durante 1 hora siguiendo el mismo método descrito anteriormente. Del mismo modo se expusieron 2 grupos de 25 mosquitos de cada población a papeles no impregnados con insecticidas a modo de control. Se siguieron los criterios de la OMS descritos en la Figura 3 para definir el grado de resistencia de éstas poblaciones.

Los ensayos enzimáticos son meticulosamente descritos en *Methods in Malaria Research* (MR4 2007). Mediante espectrofotometría se determinaron los valores de Proteína Total (TP), P450 monooxigenasa (P450), esterasas inespecíficas (EST) y glutatión-S-transferasas (GST), usando un espectrofotómetro BioTek PoweWave XS (BioTek, Vermont, USA). Para cada población (Zaragoza, Barcelona, Peñíscola, Castellon y Mallorca), 30 hembras de mosquito no alimentadas con sangre de 3 a 5 días de edad fueron individualmente homogeneizadas en 1 mL de KPO₄ buffer 0.25M, pH 7,2 y congelados para su conservación. Todos los ensayos de espectrofotometría fueron realizados en microplacas de 96 pocillos de 350 μL de capacidad cada uno (Foto 4).

El contenido de proteína total de cada homogeneizado de mosquito fue determinado con un método colorimétrico (Biorad Protein Assay) para normalizar los resultados de los demás bioensayos que se llevarán a cabo. Primeramente se debe de realizar una recta patrón con cantidades conocidas de proteína de albúmina de suero bovino (0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,125 y 0,25 mg/100 μL buffer KPO₄) a las que añadimos 200 μL de la dilución del tinte reactivo (20 ml del concentrado en 80 ml de agua destilada), haciendo dos réplicas de cada concentración. Las absorbancias fueron leídas en el espectrofotómetro rápidamente (T_0) con el filtro de 620 nm, usando los datos de ambas repeticiones para calcular dicha recta patrón (Gráfica 1).



Gráfica 1: Recta patrón de proteína

Seguidamente se realizó el ensayo con cada mosquito por duplicado, añadiendo en cada pocillo 20 µl de homogeneizado de mosquito, 80 µl de buffer KPO_4 y 200 µl de la dilución del tinte reactivo. Los valores obtenidos en el espectrofotómetro fueron trasladados a la recta patrón para conocer los miligramos de proteína presentes en cada homogeneizado. Estos datos de Proteína Total también nos pueden servir para comparar los tamaños de los mosquitos de las diferentes poblaciones. De esta manera se observó que los mosquitos de la población de laboratorio (Zaragoza) eran significativamente más grandes que los de las poblaciones de campo.

Para determinar la actividad enzimática de la P450, a 100 µl de homogeneizado de mosquito se le añadieron 200 µl de TMBZ (2nM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride) y 25 µl de H_2O_2 al 3%. La mezcla fue incubada durante 5 minutos y se determinó la absorbancia a 620nm. Para la actividad de la EST, a 100 µl de homogeneizado de mosquito se añadieron 100 µl de 3mM naphthyl acetate, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de O-dianisidine tetrazotized (1 mg/ml) y dos minutos después se leyó la absorbancia a 540nm. Para la actividad de la GST, se añadieron a 100 µl de homogeneizado de mosquito 100 µl de 2mM glutatión reducido y 100 µl de 1mM 1-chloro-2,4'-dinitrobenzene (cDNB), leyéndose a 320nm inmediatamente (T_0) y después de 5 minutos (T_5). La diferencia de T_5 menos T_0 es el valor usado en los análisis estadísticos para GST. Todos los análisis fueron llevados a cabo en triplicado con cada uno de los 30 mosquitos de cada población, y fueron comparados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y un test post-hoc de Tukey.

4. TRABAJOS PUBLICADOS

4.1 Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain

GROUND ULTRA-LOW VOLUME ADULTICIDING FIELD TRIALS USING PYRETHROIDS AGAINST *Aedes albopictus* IN THE BAIX LLOBREGAT REGION, SPAIN

MIKEL BENGEO,¹ ROGER ERITJA^{2,3} AND JAVIER LUCIENTES¹

ABSTRACT. Ground ultra-low volume (ULV) application against *Aedes albopictus* is a challenging methodology as its efficacy is strongly related to environmental conditions, insect behavior, and the pesticide formulation. Such operations are very relevant in many control programs, although their real efficacy is often unknown. Trials were carried out as part of real-world applications in urban scenarios in the Baix Llobregat region to evaluate the efficacy of 2 active ingredients, deltamethrin and alpha-cypermethrin. Both pyrethroids were tested against caged mosquitoes placed at a range of distances and under varying environmental conditions. Additionally, persistence on plants placed at the same distances was evaluated after 5 h, as well as droplet distribution using water-sensitive papers. The deltamethrin formulation used yielded significantly higher 24-h mortality than alpha-cypermethrin (100% direct mortality up to 25 m versus 10 m; and 73.9% residual 5-h mortality at 20 m compared to <50% at 5 m). The influence of environmental factors, a comparison with other field tests, and the real effect on uncaged mosquitoes is discussed.

KEY WORDS Vector control, deltamethrin, alpha-cypermethrin, space spray, persistence, droplet distribution

INTRODUCTION

In Spain, the 1st report of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus* (Skuse)) was in Catalonia (Aranda et al. 2006), where this species has reached high densities that affect ca. 57% of the land and >90% of the inhabitants (Eritja, unpublished data), with populations spreading to other areas probably due to highways (Eritja et al. 2005). The vectorial capacity of European *Ae. albopictus* was demonstrated by the Italian chikungunya outbreak in 2007 (Rezza et al. 2007), and the French (La Ruche et al. 2010) and Croatian (Schmidt-Chanasit et al. 2010) dengue cases in 2010. Further outbreaks could occur in Europe, as mentioned by the European Centre for Disease Prevention and Control. Chikungunya is more likely to occur than dengue, and Catalonia is described as a higher risk area (ECDC 2012).

Ground ultra-low volume (ULV) adulticiding applications are widely used to reduce the mosquito population, especially in emergency situations (Arredondo-Jiménez and Rivero 2006, Ordóñez-González et al. 2011, Suman et al. 2012). The World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) recommends space spray treatments against *Ae. albopictus* in anticipation of, or during, epidemics of dengue or yellow fever, as a complement to routine destruction of peridomestic breeding sites and larviciding

(WHO 2006a). Since *Ae. albopictus* is strongly related to vegetation (Bohart 1957), residual treatment of plants with insecticide to act as a chemical barrier is also used to control the distribution of this species (Perich et al. 1993, Amoo et al. 2008, Cilek and Hallmon 2008, Bengoa et al. 2013). The control methods for *Ae. albopictus* carried out by the Mosquito Control Service of the Baix Llobregat region in Catalonia (hereinafter referred to as MCS) include community-based programs to raise awareness, intensive larviciding in public areas, and sporadic adulticiding via a truck-mounted ULV sprayer to reduce local population peaks.

The use of ground ULV applications may effectively reduce the adult mosquito population (Gratz 1991), but it is usually not sustainable by itself and could favor the development of insecticide resistance in mosquitoes (Khan et al. 2011). *Aedes albopictus* frequently uses urban areas as breeding sites where human blood sources are abundant (Colless 1959, Ponlawat and Harrington 2005, Muñoz et al. 2011). This raises toxicological issues related to wide pesticide applications. Subsequently, ULV adulticiding is perceived by the majority in Europe as an emergency resource, and legal regulations are increasingly restrictive.

The evolution of the legal European Union pesticide framework through the Biocide Product Directive (98/8/CE) and the Plant Protection Product Directive (91/414/EEC) has led to the MCS changing the adulticide it uses from a plant protection product (alpha-cypermethrin: Fastac®), which was previously applied in the Baix Llobregat region against *Ae. caspius* (Pallas) and *Culex pipiens* L., to a biocide product (deltamethrin: Aqua K-othrine®). Unlike the

¹ Department of Parasitology, Veterinary Faculty, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain.

² Servei de Control de Mosquits, Consell Comarcal del Baix Llobregat, Parc Torreblanca, 08980 Sant Feliu de Llobregat, Spain.

³ To whom correspondence should be addressed.

synergized pyrethroids commonly used against adult mosquitoes, there are few studies about the ULV efficacy of deltamethrin (Marcombe et al. 2009, Chaskopoulou et al. 2011). One of these studies, reported by WHOPEs, recommends the use of the commercial deltamethrin-based product Aqua K-othrine for ULV applications (WHO 2006b). To our knowledge, there are no data on the efficacy of ULV spatial applications of alpha-cypermethrin, which has mostly been used over surfaces in residual applications (Sulaiman et al. 1996, Rowland et al. 2000, Tseng et al. 2008, Pettit et al. 2010).

This study was designed to assess the control efficacy attained by ULV applications of both active ingredients carried out by the MCS. Weather conditions such as wind speed and turbulence may influence droplet distribution and the efficacy of ULV treatments (Mount 1998, Bonds 2012). Fortunately, the target species is more active in the morning and afternoon, when meteorological conditions are ideal (wind speed of 1–4 m/sec) (WHO 2003). Landscape configuration may also challenge applications in urbanized areas. One classic case study shows how heavy infestations occur in cemeteries (Mulla et al. 1977, Romi et al. 1999), where operators must adapt the application path to the buildings and pathways.

Therefore, we decided to carry out the trials presented here, to assess the constraints and expected efficacy in urban environments of the Baix Llobregat region (Barcelona, Spain). The trials were embedded within real-world applications.

MATERIALS AND METHODS

The trials were carried out in the field during routine operations. The efficacy of the ULV applications was measured by 2 types of assays performed simultaneously: assessments of the mortality of caged mosquitoes placed at increasing distances from the ULV generator, and assessments of the residual mortality caused by plants placed besides the cages that received the application. Droplet density was measured on water-sensitive papers (WSPs). A local strain of *Ae. albopictus* that was reared in the MCS laboratory according to the methodology described by Alarcón-Elbal (2010) was used for the trials. No insecticide resistance has been reported for this strain or in the area, where pyrethroids have been scarcely used.

Study sites

Sites for the application of adulticide ULV treatments need to meet certain legal and practical prerequisites. They must be easily delimited to ensure that nobody is present during the application or during the 24-h posttreatment

safety period stated on the product label. Additionally, for testing purposes, the study sites should have a flat area at least 25 m long perpendicular to an accessible path for the application vehicle. The area should ideally be positioned in the same direction as the prevailing wind during the test.

Cemeteries are important breeding areas for this species (Schultz 1989, O'Meara et al. 1992), and most of them meet the mentioned requirements. Five cemeteries in the Baix Llobregat area were selected for the trials at a time when local interventions were necessary due to an increase in *Ae. albopictus* problems. An additional vacant industrial warehouse (95 m long, 35 m wide, and >10 m to the roof) was also used to complete the replicates.

The cemeteries treated with alpha-cypermethrin in September–October 2010 were in the towns of Molins de Rei (Site A: 41°25'14"N, 2°1'8"E), Sant Joan Despí (Site B: 41°22'30"N, 2°4'39"E), and Esplugues de Llobregat (Site C: 41°22'11"N, 2°4'2"E). The cemeteries treated with deltamethrin in July 2011 were in El Prat de Llobregat (Site D: 41°18'44"N, 2°6'24"E) and Castelldefels (Site F: 41°17'11"N, 1°58'28"E), and the empty warehouse was in Castelldefels (Site E: 41°17'18"N, 1°58'15"E).

Pesticides and application equipment

The machinery used for all trials was a truck-mounted Martignani Phantom "Minor B-748" model sprayer with a ULV accessory nozzle (Martignani SRL S. Agata sul Santerno, RA, Italy). The flow rate was adjusted to 50 liters/h. The sprayer head was positioned to discharge horizontally and perpendicular to the direction of movement, at a height of 2.5 m. According to the manufacturer, the average spray reach is 30–35 m. The dosages were calculated accordingly, and the speed of the vehicle was set as constant. Sufficient insecticide dilution was prepared in the tank to avoid intermittent spraying due to discontinuity in the pump feeding (Britch et al. 2010).

Fastac (BASF Española, Barcelona, Spain) is a 10% weight/weight (w/w) alpha-cypermethrin emulsifiable concentrate. This formulation is intended for agricultural purposes, but has been used in public health scenarios against cockroaches, mosquitoes, flies, and other insects (Yordanova et al. 2009). Fastac was diluted in water at 0.25% according to the manufacturer's directions for residual vegetation applications. Under the standard conditions of 50 liters/h flow rate, 30 m range, and 5 km/h vehicle speed, the estimated application dose was 0.83 g AI/ha.

Aqua K-othrine (Bayer Environmental Science, Alcácer, Spain) is an emulsion formulation containing 2.03% w/w deltamethrin. This product is designed for spraying and cold fogging against

flying insects, but can also be used in thermal fogging. As claimed by the manufacturer, it includes a proprietary technology (FFAST®) to avoid the evaporation issues that are frequently experienced when water is used as a solvent, which reduce the effective reach. The application dose was 1 g AI/ha, as recommended by the manufacturer and by WHOPES (WHO 2006b).

Evaluation

Caged mosquitoes were used to assess the mortality and effective reach of the applications. Groups of 20 *Ae. albopictus* females (2–5 days old) were transferred in the laboratory to cylindrical sentinel cages (6.5-cm diam and 26-cm height, covered with a 1-mm mesh screen wire) that are in line with the WHOPES recommendations for field trials (WHO 2009). Cotton balls impregnated with sucrose water were placed over the cages as a food and humidity supply during transportation to the testing sites, which were located approximately 25 min from the lab. At the testing ground, wooden T-poles were placed linearly in a cleared area at 5, 10, 15, 20, and 25 m perpendicular to the application path. Three sentinel cages separated by 0.5 m were hung from each pole at 1.5-m height (Arrendondo-Jiménez and Rivero 2006). Three more sentinel cages were located outside the test area as a control. The setup was placed in the field 15 min before each treatment, and removed 15 min after its end. Between 15 and 30 min after the treatment, all mosquitoes were transferred by aspiration without anaesthetization to clean containers (plastic cylinders 9-cm diam and 5-cm height covered with 0.2-mm mesh) to avoid secondary mortality (Barber et al. 2006). The initial knockdown at 30 min was accounted for at the study site, and then the mosquitoes were brought back to the laboratory. There, both the knockdown effect at 1 h and 24-h mortality were recorded (Suman et al. 2012). The wind speed and direction, the air temperature, and the humidity during the treatment were measured with a portable meteorological station, PCE-FWS 20® (PCE Iberia, Tobarra, Spain).

A method based on the excised leaf bioassay (Madden et al. 1947, Britch et al. 2009, Doyle et al. 2009) was used to study any possible added residual effect of ULV treatments on vegetation. The plants used in the test were bushes of the “compact” variety of *Euonymus japonicus* Thunb, commonly known as the Japanese Spindle, purchased from a commercial garden shop. The test was carried out at sites B, D, E, and F. In order to suppress any possible residues, the plants were thoroughly cleaned with tap water and then exposed to direct sunlight for the week prior to the trial. One plant was placed on the ground at the base of each of the T-poles at 5, 10, 15, 20,

and 25 m from the application path. One additional plant was placed outside the test area as a control. The plants were transferred to the laboratory where 3 branches with 10 leaves each were cut from each bush 5 h after the application. Each branch was placed in a clean container (plastic cylinder 9-cm diam and 5-cm height covered with 0.2-mm mesh) where 10 *Ae. albopictus* females (2–5 days old) were introduced for exposure, and checked for mortality at 24 h.

The WSPs (Syngenta crop protection AG, Basel, Switzerland) were placed perpendicular to the ground at a height of 1.5 m over each T-pole at site E to study the volume median diameter ($Dv_{0.5}$) and the density (droplets/cm²) of the pesticide cloud throughout the treated area. The diameter of the spots on the WSPs was visually measured using a calibrated Olympus BH-2 microscope (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan). The WSPs were also scanned at 2,400 dots per inch (dpi) using an Epson GT-15000 scanner (Seiko Epson Corp., Nagano, Japan). ImageJ software developed at the National Institutes of Health (Abramoff et al. 2004) was used to count the imprints on the papers scanned at 2,400 dpi and to calculate the droplet size.

Statistical analysis

The mortality obtained in each treated cage was adjusted with the mean mortality from control cages using Abbott's (1925) formula. Negative values resulting from this transformation were set as zero. A variance component test with the restricted maximum likelihood method (REML) was conducted to assess the homogeneity among the 3 sentinel cages for each distance at each study site. A generalized linear model (GLM) procedure was conducted to analyze differences among the mortalities obtained at the different study sites in relation to the distance. For this analysis, study sites and distances from the nozzle were used as the categorical predictors, whereas mortality observed in the different time periods (30-min knockdown, 1-h knockdown, and 24-h mortality) were the dependent variables. Differences between means were compared using Tukey's multiple range test and were considered significant at $P < 0.05$. The beta coefficient of GLM analysis was also used to determine the most influential factor affecting the mortality for each insecticide. The advantage of beta coefficients is that they can be used to compare the relative contribution of each predictor independent variable.

Mortalities from the excised leaf bioassay were also adjusted with Abbott's (1925) formula before being analyzed with a 1-way ANOVA test at each distance using mortality as the main variable and study site as the categorical predictor. A linear regression was conducted with the number of

impacts/cm² and $Dv_{0.5}$ onto the WSP. All statistics and graphics were computed using STATISTICA (StatSoft 2004) software.

RESULTS

Pooled results for all direct mortality tests are shown in Table 1. According to the REML tests for all the time periods, the variable “cage” did not introduce heterogeneity into the mortality results ($P > 0.0005$), so this variable can be discarded from further analysis. Study site A was the alpha-cypermethrin site where the lowest humidity was registered (54%), while study site C was the one with the highest humidity (69%). No appreciable wind was measured at study site C. At study site E, there was no wind since the test was performed inside a warehouse, so droplet drift could only be attributed to the ULV machine’s fan. The highest humidity was recorded at this site. At study site F, a downwind application was not possible due to the risk of drift toward buildings outside of the facility. Therefore, the application had to be performed slightly upwind.

A comparison of the study sites using GLM and the Tukey test (Table 1) revealed significant differences between the tests and showed that Aqua K-othrine in optimal conditions (E and F) yielded the highest mortality figures. The 24-h mortality at study sites C, B, F, and A were in a homogeneous group ($\alpha = 0.05$) at a lower level. Therefore, with the exception of test F carried out in very adverse conditions, the applications using Aqua K-othrine performed better than Fastac.

In the Aqua K-othrine treatments, the GLM results determined that wind was the main variable affecting 24-h mortality (Fig. 1), as its beta coefficient (0.60) was higher than temperature and humidity, and even higher than distance. This was not the case for the Fastac analysis (Fig. 1) because the wind speed was more homogeneous within those test series. In these tests the main factor was distance, as expected.

The persistence of alpha-cypermethrin on excised leaves was assessed at study site B, where the bushes caused 44.8% 24-h mortality at 5 m and 37.9% at 10 m (Table 2). No significant mortality was observed beyond that distance. With deltamethrin, the 24-h mortality was higher than 70% in the 1st 20 m into study sites D and E. Upwind application at study site F yielded homogeneous mortality of 48–44% in the 1st 15 m, and dropped at greater distances.

The distribution of insecticide droplets was measured at study site E (Fig. 2). The number and $Dv_{0.5}$ of droplets decreased as we moved away from the nozzle. The number of droplets per square centimeter at 5 m was 356. The figure then dropped linearly ($y = -91.138x + 420.9$; $R^2 = 0.9558$) to 3 droplets/cm² at 25 m. The $Dv_{0.5}$

was 411 μ m at 5 m and 194 μ m at 25 m ($y = -59.7x + 483.9$; $R^2 = 0.938$).

DISCUSSION

In our ULV trials, Fastac showed consistently lower mortality rates against *Ae. albopictus* than Aqua K-othrine. This could be caused by the lower dose of alpha-cypermethrin than deltamethrin (0.83 g AI/ha and 1 g AI/ha, respectively), by the environmental parameters during the tests, or by the efficacy of the active ingredient. In addition, the Aqua K-othrine formulation (FFAST) is claimed to reduce the evaporation of smaller droplets, which means that it could be more likely to affect mosquitoes as more droplets would remain in the air and a greater amount of insecticide will be deposited on plants.

Few reports have been published on water-based unsynergized pyrethroids applied with ground ULV machinery. The WHOPES review of Aqua K-othrine (at a dose of 1 g AI/ha) mentioned a mortality of >86% on *Ae. albopictus* in caged bioassays up to 50 m downwind from the point of spray discharge, which demonstrated the good adulticidal efficacy of Aqua K-othrine (WHO 2006b). Chaskopoulou et al. (2011) studied the efficacy of this formulation applied by aerial ULV applications against *Ae. caspius*, *Cx. modestus* Ficalbi, and *Anopheles sacharovi* Favre, to obtain 69% mortality with the same dose of 1 g AI/ha. Marcombe et al. (2009) studied the effect of Aqua K-othrine thermal fogging against *Ae. aegypti*, L., but low mortality was obtained because the population was pyrethroid resistant. There are no reports about Fastac efficacy against mosquitoes, since this product is focused in agriculture. However, Fendona (Shell Public Health, United Kingdom), a similar product (alpha-cypermethrin 6%) registered for public health, was evaluated by Sulaiman et al. (1995) against *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* using thermal fogging (0.01 g AI/m²). They found high mortalities in mosquito adults and larvae. In any case, the values obtained from field tests cannot be compared directly because environmental factors and local site characteristics may influence the effectiveness drastically.

As observed by other authors (Lothrop et al. 2007, Britch et al. 2010), wind speed and direction are one of the main climatic factors that influence the effectiveness of adulticide ULV applications. Applications are not recommended in upwind conditions (WHO 2003). However, when the ground configuration or other factors lead to emergency upwind treatments, the efficacy will dramatically decrease. In our case, the downwind treatment with Aqua K-othrine caused >80% direct mortality rates beyond 25 m from the machine. However, at study site F with a 4–7 km/h upwind, satisfactory mortality was only

Table 1. Overall 24-h mortality (%) for caged adult *Aedes albopictus* exposed to direct spray located at different distances ($n = 20$).¹

Product		Fastac							
Study site:		A				B			
Day:		Sep. 27, 2010				Sep. 28, 2010			
Wind (km/h):		4-7 downwind				2-5 downwind			
Temperature (°C):		20				21			
Humidity (%):		54				64			
Time: ²		30 min (1;2)	1 h (1)	24 h (1)	30 min (2;3)	1 h (1)	24 h (1)	30 min (1)	1 h (1)
Distance (m):									
5		30.00 ± 5.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	66.67 ± 11.55	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	6.67 ± 2.89	100.00 ± 0.00
10		16.67 ± 2.89	93.33 ± 7.64	100.00 ± 0.00	48.33 ± 10.41	95.00 ± 5.00	100.00 ± 0.00	10.00 ± 5.00	96.67 ± 5.77
15		3.33 ± 2.89	15.00 ± 5.00	35.00 ± 5.00	6.67 ± 7.64	21.67 ± 12.58	81.67 ± 7.64	0.00 ± 0.00	75.00 ± 15.00
20		0.00 ± 0.00	1.67 ± 2.89	8.33 ± 2.89	0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.89	15.00 ± 5.00	0.00 ± 0.00	10.00 ± 5.00
25		0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.89	8.33 ± 2.89	0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.89	13.33 ± 2.89	0.00 ± 0.00	8.33 ± 5.77
Control		0.00 ± 0.00	1.67 ± 2.89	10.00 ± 5.00	0.00 ± 0.00	5.00 ± 5.00	13.33 ± 5.77	0.00 ± 0.00	3.33 ± 2.89
Product		Aqua K-othrine							
Study site:		D				E			
Day:		Jul. 4, 2011				Jul. 6, 2011			
Wind (km/h):		5-10 downwind				0 (indoors)			
Temperature (°C):		31				27.3			
Humidity (%):		68				85			
Time: ²		30 min (3)	1 h (2)	24 h (2)	30 min (4)	1 h (2)	24 h (2)	30 min (1;2)	1 h (1)
Distance (m)									
5		96.67 ± 5.77	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	96.67 ± 2.89	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	10.00 ± 5.00	90.00 ± 8.66
10		56.67 ± 23.09	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	98.33 ± 2.89	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	45.00 ± 10.00	96.67 ± 5.77
15		0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	93.33 ± 7.64	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	11.67 ± 12.58	75.00 ± 8.66
20		10.00 ± 10.00	93.33 ± 5.77	100.00 ± 0.00	86.67 ± 10.41	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	5.00 ± 5.00	21.67 ± 2.89
25		10.00 ± 10.00	90.00 ± 10.00	100.00 ± 0.00	56.67 ± 12.58	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	3.33 ± 5.77	13.33 ± 2.89
Control		0.00 ± 0.00	25.00 ± 5.00	28.33 ± 2.89	0.00 ± 0.00	8.33 ± 2.89	25.00 ± 5.00	0.00 ± 0.00	8.33 ± 2.89

¹ All values represented in mean ± σ.

² Similar numbers at each time period encompass homogeneous groups ($\alpha = 0.05$) according to the Tukey test. Lower numbers mean lower mortalities.

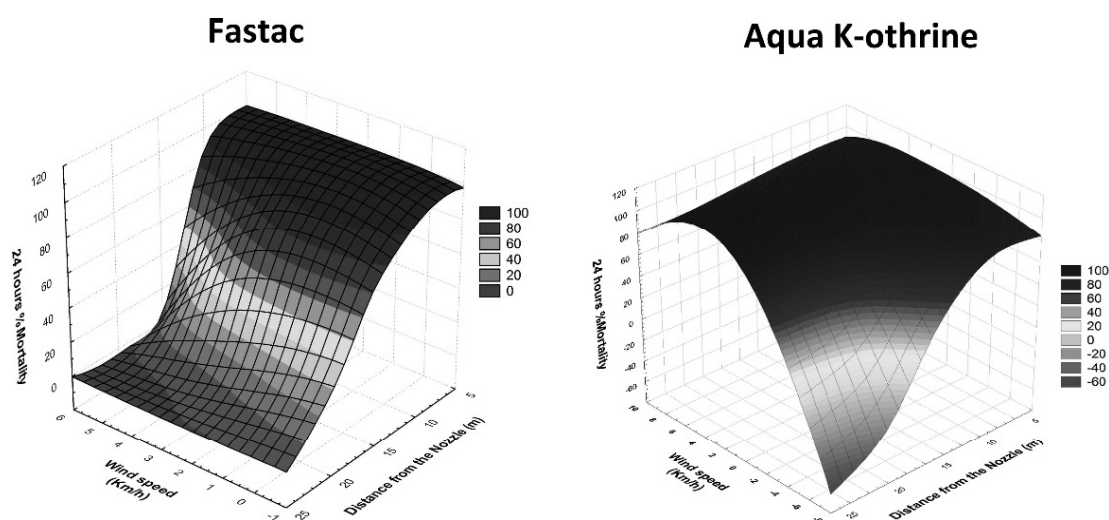


Fig. 1. Influence of the wind speed on 24-h mortality percentages on caged mosquitoes by distances.

achieved within the 1st 15 m from the nozzle. When no wind was blowing during the treatment, high values were obtained because the ULV machine generates its own air jet. It should be taken into account that the insecticide cloud may reach greater distances in favorable wind conditions, but the application may be less effective, since the same quantity of active ingredient is spread over a larger area.

The registered mortality is not always related with the real direct mortality (Boobar et al. 1988), since there are estimates of 50% to 70% reduction of spray penetrating the cages (Hoffmann et al. 2008, Fritz et al. 2010), depending on the wind speed (Fritz et al. 2012). In contrast, insecticide deposits on screens could increase the mortality (Barber et al. 2006, Bonds et al. 2010). Even in field tests, the results cannot be transposed to operative conditions because real mosquitoes are not found resting in cages in the path of the insecticide cloud, but rather resting within vegetation, and the resting behavior of mosquitoes can influence ULV efficacy (Perich et al. 2000).

Both deltamethrin (Sharma et al. 1996, Ansari et al. 1997, Rozilawati et al. 2005, Rohani et al. 2006) and alpha-cypermethrin (Sulaiman et al. 1996, Rowland et al. 2000, Tseng et al. 2008) have been applied over surfaces for residual control of vector mosquitoes, with optimal results. Deltamethrin persistence has also been evaluated in vegetation bioassays by Cilek and Hallmon (2006), who found mortalities of 100% during 12 wk posttreatment (applied at maximum rates to the point of runoff), and by Bengoa et al. (2013), who observed >80% residual mortality up to 12 days (applied at 0.0102 g AI/m²). In our study, even at the low output provided by ULV technology, we demonstrated a short period of insecticide efficacy on plants. Aqua K-othrine-treated plants killed more mosquitoes than those treated with Fastac, even under challenging atmospheric conditions, after 5 h. The low dose of deltamethrin deposited on plants placed 20 m away from the ULV nozzle could still suppress >80% of the mosquitoes landing 5 h after treatment. This highlights the potential additional interest of ULV applications and confirms results

Table 2. Overall 24-h mortality (%) adjusted with Abbott's (1925) formula for adult *Aedes albopictus* exposed to excised leaves from bushes located at different distances, 5 h after being treated ($n = 10$).¹

Product		Fastac		Aqua K-othrine	
Study site		B	D	E	F
Distance (m)	5	44.8 ± 6.0 a	100.0 ± 0.0 c	78.3 ± 7.5 b	48.0 ± 6.9 a
	10	37.9 ± 10.3 a	100.0 ± 0.0 b	91.3 ± 15.1 b	44.0 ± 6.9 a
	15	10.3 ± 6.0 a	100.0 ± 0.0 c	60.9 ± 13.0 b	48.0 ± 18.3 b
	20	4.6 ± 4.0 a	85.7 ± 12.4 c	73.9 ± 13.0 c	24.0 ± 6.9 b
	25	4.6 ± 4.0 a	67.9 ± 10.7 b	52.2 ± 19.9 b	6.7 ± 8.3 a

¹ All values represented in mean ± σ . Means followed by same letter in a row are not significantly different ($P < 0.05$; 1-way ANOVA).

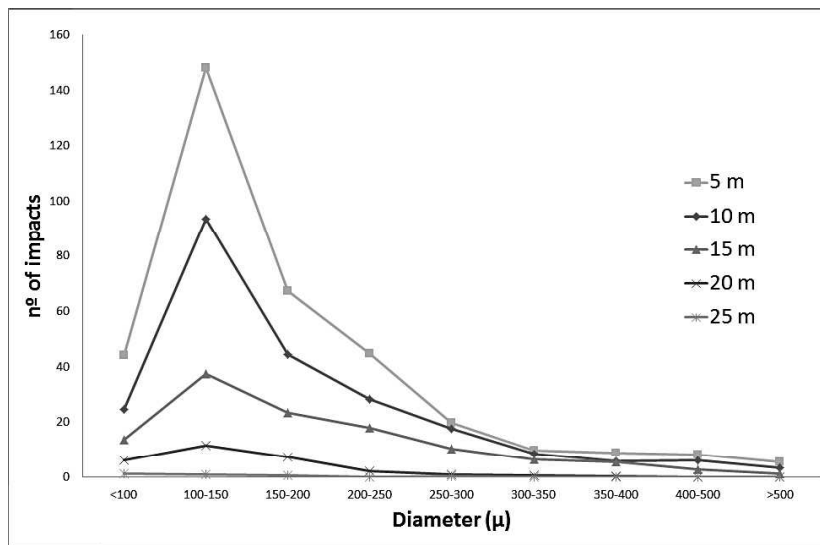


Fig. 2. Cloud densities and mean diameters of the Aqua K-othrine® droplets by distance from the nozzle.

such as those obtained by Britch et al. (2010), indicating that a considerably small amount of active ingredient is enough to kill a mosquito. In an operational context, it might be worth partially focusing the application on existing vegetation known to be a refuge for *Ae. albopictus* individuals.

The WSP method was not really suitable for recording droplets smaller than 50 µm (Hoffmann and Hewitt 2005) because such droplets do not generally contain enough water to create a detectable stain on the substrate. In this trial, the smallest droplet visually measured was 68 µm. Other smaller stains were visible, but were discarded since they could be false-positive records caused by the high humidity. The software also had problems detecting these stains, even though the scanning parameters allowed ca. 11-µm theoretical resolution. However, this method is still adequate to assess the distribution of the droplets across the insecticide cloud. The droplet size should be 5 to 50 µm for adult mosquito control using ground ULV space spraying, as the optimum $Dv_{0.5}$ is 12–20 µm (Bonds 2012). Unfortunately, these droplets could not be recorded with WSP methodology. However, fair mortalities obtained at the longest distances confirmed that smaller droplet sizes were reaching these areas.

These trials show that ULV application technology combined with adequate pesticides can achieve 100% control of the mosquitoes placed up to 25-m distance in the path of the spray. However, this efficacy would be lower in wild uncaged mosquitoes resting within vegetation. Decisions about application strategies need to consider factors such as those derived from disease presence, cost and effectiveness, ecotoxicity, resistance

management, burden to citizens, and regulation constraints.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to the MCS of the Baix Llobregat Council staff and crew for their assistance with the treatments and data collection. Thanks to Xabier Amenós from Bayer Environmental Science Spain for providing the Aqua K-othrine, Carlos Calvete for the statistical analyses, and Jordi Llop for the ImageJ software.

REFERENCES CITED

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267.
- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11:36–42.
- Alarcón-Elbal PM, Delacour S, Pinal R, Ruiz-Arondo I, Muñoz A, Bengoa M, Eritja R, Lucientes J. 2010. Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 69:140–148.
- Amoo AO, Xue RD, Qualls WA, Quinn BP, Bernier UR. 2008. Residual efficacy of field-applied permethrin, d-phenothrin, and resmethrin on plant foliage against adult mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 24:543–549.
- Ansari MA, Mittal PK, Razdan RK, Batra CP. 1997. Residual efficacy of deltamethrin 2.5 wp (K-othrin) sprayed on different types of surfaces against malaria vector *Anopheles culicifacies*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28:606–609.
- Aranda C, Eritja R, Roiz D. 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol* 20:150–152.

- Arrendondo-Jiménez JI, Rivero NE. 2006. Space treatments of insecticide for control of dengue virus vector *Aedes aegypti* in southern Mexico. I. Baseline penetration trials in open field and houses. *J Am Mosq Control Assoc* 22:301–305.
- Barber JAS, Greer M, Coughlin J. 2006. The effect of pesticide residue on caged mosquito bioassays. *J Am Mosq Control Assoc* 22:469–472.
- Bengoa M, Eritja R, Lucientes J. 2013. Laboratory tests of the residual effect of deltamethrin on vegetation against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 29:284–288.
- Bohart RM. 1957. Insects of Micronesia Diptera: Culicidae. Volume 12. Honolulu, HI: Bernice P. Bishop Museum. p 57–58.
- Bonds JAS. 2012. Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Med Vet Entomol* 26:121–130.
- Bonds JAS, Greer M, Coughlin J, Patel V. 2010. Caged mosquito bioassay: studies on cage exposure pathways, effects of mesh on pesticide filtration, and mosquito containment. *J Am Mosq Control Assoc* 26:50–56.
- Boobar LR, Dobson SE, Perich MJ, Darby WM, Nelson JH. 1988. Effects of screen materials on droplet size frequency distribution of aerosols entering sentinel mosquito exposure tubes. *Med Vet Entomol* 2:379–384.
- Britch SC, Linthicum KJ, Wynn WW, Walker TW, Farooq M, Smith VL, Robinson C, Lothrop B, Snelling M, Gutierrez A, Lothrop HD, Kerce JD, Becnel JJ, Bernier UR, Pridgeon JW. 2010. Evaluation of ULV and thermal fog mosquito control applications in temperate and desert environments. *J Am Mosq Control Assoc* 26:183–197.
- Britch SC, Linthicum KJ, Wynn WW, Walker TW, Farooq M, Smith VL, Robinson CA, Lothrop BB, Snelling M, Gutierrez A, Lothrop HD. 2009. Evaluation of barrier treatments on native vegetation in a southern California desert habitat. *J Am Mosq Control Assoc* 25:184–193.
- Chaskopoulou A, Latham MD, Pereira RM, Connelly R, Bonds JAS, Koehler PG. 2011. Efficacy of aerial ultra-low volume applications of two novel water-based formulations of unsynergized pyrethroids against riceland mosquitoes in Greece. *J Am Mosq Control Assoc* 27:414–422.
- Cilek JE, Hallmon CF. 2006. Residual effectiveness of pyrethroid-treated foliage against adult *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* in screened field cages. *J Am Mosq Control Assoc* 22:725–731.
- Cilek JE, Hallmon CF. 2008. Residual effectiveness of three pyrethroids on vegetation against adult *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* in screened field cages. *J Am Mosq Control Assoc* 24:263–269.
- Colless D. 1959. Notes on the culicine mosquitoes of Singapore. VII. Host preferences in relation to the transmission of disease. *Ann Trop Med Parasitol* 53:259–267.
- Doyle MA, Kline DL, Allan SA, Kaufman PE. 2009. Efficacy of residual Bifenthrin applied to landscape vegetation against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 25:179–183.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2012. *The climatic suitability for dengue transmission in continental Europe*. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control.
- Eritja R, Escosa R, Lucientes J, Marquès E, Molina R, Roiz D, Ruiz S. 2005. Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges for Spain. *Biol Invasions* 7:87–89.
- Fritz BK, Hoffmann WC, Farooq M, Walker T, Bonds J. 2010. Filtration effects due to bioassay cage design and screen type. *J Am Mosq Control Assoc* 26:411–421.
- Fritz BK, Hoffmann WC, Haas K, Bonds J. 2012. Correction of spray concentration and bioassay cage penetration data. *J Am Mosq Control Assoc* 28:320–322.
- Gratz NG. 1991. Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. *J Am Mosq Control Assoc* 7:353–365.
- Hoffmann W, Hewitt A. 2005. Comparison of three imaging systems for water-sensitive papers. *Appl Eng Agric* 21:961–964.
- Hoffmann WC, Fritz BK, Farooq M, Cooperband MF. 2008. Effects of wind speed on aerosol spray penetration in adult mosquito bioassay cages. *J Am Mosq Control Assoc* 24:419–426.
- Khan HA, Akram W, Shehzad K, Shaalan EA. 2011. First report of field evolved resistance to agrochemicals in dengue mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), from Pakistan. *Parasit Vectors* 4:146.
- La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, Lenglet A, Jourdain F, Leparc-Goffart I, Charlet F, Ollier L, Mantey K, Mollet T, Fournier JP, Torrents R, Leitmeyer K, Hilairet P, Zeller H, Van Bortel W, Dejourn-Salamanca D, Grandadam M, Gastellu-Etcheberry M. 2010. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill* 15:19676.
- Lothrop H, Lothrop B, Palmer M, Wheeler S, Gutierrez A, Miller P, Goms D, Reisen WK. 2007. Evaluation of pyrethrin aerial ultra-low volume applications for adult *Culex tarsalis* control in the desert environments of the Coachella Valley, Riverside County, California. *J Am Mosq Control Assoc* 23:405–419.
- Madden AH, Schroeder HO, Lindquist AW. 1947. Residual spray applications to salt-marsh and jungle vegetation for control of mosquitoes. *J Econ Entomol* 40:119–123.
- Marcombe S, Carron A, Darriet F, Etienne M, Agnew P, Tolosa M, Yp-Tcha MM, Lagneau C, Yébakima A, Corbel V. 2009. Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. *Am J Trop Med Hyg* 80:745–751.
- Mount G. 1998. A critical review of ultralow-volume aerosols of insecticide applied with vehicle-mounted generators for adult mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 14:305–334.
- Mulla MS, Darwazeh HA, Dhillon MS. 1977. Cemetery mosquitoes and their control with organophosphorus larvicides and the insect growth regulator methoprene. *Proc Pap Mosq Vector Control Assoc Calif* 45:162–165.
- Muñoz J, Eritja R, Alcaide M, Montalvo T, Soriguer RC, Figuerola J. 2011. Host-feeding patterns of native *Culex pipiens* and invasive *Aedes albopictus* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban zones from Barcelona, Spain. *J. Med Entomol* 48:956–960.
- O'Meara GF, Gettman AD, Evans LF, Scheel FD. 1992. Invasion of cemeteries in Florida by *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 8:1–10.

- Ordoñez-González JG, Thirion J, Orozco AG, Rodríguez AD. 2011. Effectiveness of indoor ultra-low volume application of Aqua Reslin® Super during an emergency. *J Am Mosq Control Assoc* 27:162–164.
- Perich MJ, Davila G, Turner A, Garcia A, Nelson M. 2000. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. *J Med Entomol* 37:541–546.
- Perich MJ, Tidwell MA, Dobson SE, Sardelis MR, Zaghlul A, Williams DC. 1993. Barrier spraying to control the malaria vector *Anopheles albimanus*: laboratory and field evaluation in the Dominican Republic. *Med Vet Entomol* 7:363–368.
- Pettit WJ, Whelan PI, McDonnell J, Jacups SP. 2010. Efficacy of alpha-cypermethrin and lambda-cyhalothrin applications to prevent *Aedes* breeding in tires. *J Am Mosq Control Assoc* 26:387–397.
- Ponlawat A, Harrington LC. 2005. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *J Med Entomol* 42:844–849.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A. 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in temperate region. *Lancet* 370:1840–1846.
- Rohani A, Zamree I, Lee HL, Hassan R, David L, Kamilan D. 2006. Comparative field evaluation of residual-sprayed deltamethrin WG and deltamethrin WP for the control of malaria in Pahang, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37:1139–1148.
- Romi R, Di Luca M, Majori G. 1999. Current status of *Aedes albopictus* and *Aedes atropalpus* in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 15:425–427.
- Rowland M, Mahmood P, Iqbal J, Carneiro I, Chavasse D. 2000. Indoor residual spraying with alphacypermethrin controls malaria in Pakistan: a community-randomized trial. *Trop Med Int Health* 5:472–481.
- Rozilawati H, Lee HL, Mohd Masri S, Mohd Noor I, Rosman S. 2005. Field bioefficacy of deltamethrin residual spraying against dengue vectors. *Trop Biomed* 22:143–148.
- Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schoneberg I, Gunther S, Stark K, Frank C. 2010. Dengue virus infection in a traveler returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill* 15:3–4.
- Schultz GW. 1989. Cemetery vase breeding of dengue vectors in Manila, Republic of the Philippines. *J Am Mosq Control Assoc* 5:508–513.
- Sharma DN, Joshi RD, Srivastava PK, Yadava RL, Sadanand AV, Appavoo NC, Ramdoss V. 1996. Impact of deltamethrin spraying on malaria transmission in Rameshwaram Island, Tamil Nadu State—India. *J Commun Dis* 28:38–44.
- StatSoft. 2004. *STATISTICA data analysis software system, version 7*. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.
- Sulaiman S, Karim MA, Omar B, Omar S. 1995. Field evaluation of alphacypermethrin and lambda-cyhalothrin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Malaysia. *J Am Mosq Control Assoc* 11:54–58.
- Sulaiman S, Pawanchee ZA, Ghauth I, Wahab A, Vadiveloo B, Jeffery J, Mansor AF. 1996. The residual effects of alphacypermethrin and permethrin against the dengue vector *Aedes albopictus* (Skuse) in wooden huts in Malaysia. *J Vector Ecol* 21:85–88.
- Suman DS, Healy SP, Farajollahi A, Crans SC, Gaugler R. 2012. Efficacy of Duet dual-action adulticide against caged *Aedes albopictus* with the use of an ultra-low volume cold aerosol sprayer. *J Am Mosq Control Assoc* 28:338–340.
- Tseng LF, Chang WC, Ferreira MC, Wu CH, Rampao HS, Lien JC. 2008. Rapid control of malaria by means of indoor residual spraying of alphacypermethrin in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. *Am J Trop Med Hyg* 78:248–250.
- WHO [World Health Organization]. 2003. *Space spray application of insecticides for vector and public health pest control—a practitioner's guide*. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO [World Health Organization]. 2006a. *Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance*. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO [World Health Organization]. 2006b. *Report of the ninth WHOPES Working Group meeting. Review of Dimilin GR and DT, Vectobac DT, Aqua K-othrine, Aqua Reslin Super*. WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO [World Health Organization]. 2009. *Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications*. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.2. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Yordanova V, Stoyanova T, Traykov I, Boyanovsky B. 2009. Toxicological effects of Fastac insecticide (alpha-cypermethrin) to *Daphnia magna* and *Gammarus pulex*. *Biotechnol Biotechnol Equip* 23:393–395.

4.2 Laboratory tests of the residual effect of Deltamethrin on vegetation against *Aedes albopictus*.

SCIENTIFIC NOTE

LABORATORY TESTS OF THE RESIDUAL EFFECT OF DELTAMETHRIN ON VEGETATION AGAINST *AEDES ALBOPICTUS*

MIKEL BENGEOA,^{1,3} ROGER ERITJA^{2,4} AND JAVIER LUCIENTES¹

ABSTRACT. *Aedes albopictus*, the Asian tiger mosquito, was 1st detected in Spain in 2004 and since then has spread along the Mediterranean coast. New adulticiding strategies are being tested to enhance control of the species. The residual effect of applications of 2 formulations containing deltamethrin over vegetation was evaluated in bioassay tests for 34 days. *Hedera helix* plants were treated with K-othrine SC25® (deltamethrin 2.56% SC) and Aqua K-othrine® (deltamethrin 2.03% EW). Bioassays consisted of exposing batches of *Ae. albopictus* females to treated plants. Significant mortality (>80%) for up to 12 days was obtained with Aqua K-othrine, and for up to 5 days using K-othrine SC25. Results show that the type of formulation has an impact on the residual effect of deltamethrin against *Ae. albopictus*. This validates the strategy of applying pyrethroid insecticides to vegetal barriers for the control of this species, as carried out in several countries.

KEY WORDS Vector control, pyrethroids, persistence, barrier, *Aedes albopictus*

In August 2004, the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse) was recorded for the 1st time in Spain by the Mosquito Control Service of the Baix Llobregat Council (hereafter MCS), in Sant Cugat del Vallès (Barcelona) (Aranda et al. 2006). Since then, it has spread to other provinces including Tarragona, Alacant (Roiz et al. 2007), Girona (Bengoa, unpublished data), Castelló (Delacour-Estrella et al. 2010), Mallorca Island (Miquel et al. 2013), and Murcia (Collantes and Delgado 2011). At present, the species is distributed along a large sector of the Spanish Mediterranean coast and is expected to spread to other areas of Spain (Eritja et al. 2005) along commercial routes (Roiz et al. 2008), following similar trends to this species introduction observed elsewhere (Dalla Pozza et al. 1994, Moore and Mitchell 1997). The integrated vector management (IVM) methods against *Ae. albopictus* in the Baix Llobregat region include community-based information programs, intensive larviciding in public areas, and adulticiding via truck-mounted ultra-low-volume (ULV) machinery. These methods are used routinely for population control and would have to be further enhanced in cases of disease transmission by this vector species. Following the recent experience in other European countries (Rezza et al. 2007, Gould et al. 2010, Schmidt-Chanasit et al. 2010)

and information as reported by Mitchell (1995), dengue and chikungunya viruses would be the most likely pathogens transmitted in Spain.

The Asian tiger mosquito is a daytime-biting species that rests in vegetation (Bohart 1957). One possible control strategy to include in IVM programs is the residual application of insecticides on resting sites to obtain a durable mortality effect when adult mosquitoes land on the treated vegetation. This strategy can be very useful in urban environments as hedges delimiting properties can be turned at a low cost into lethal barriers. A wide range of chemical insecticides have been evaluated for this purpose (Perich et al. 1993, Amoo et al. 2008, Cilek and Hallmon 2008, Britch et al. 2009). However, only Cilek and Hallmon (2006) evaluated deltamethrin as a residual barrier application on vegetation against *Ae. albopictus*. Deltamethrin is widely used for malaria control through indoor application on buildings, where *Anopheles* spp. individuals rest (WHO 2006).

In view of this, and in order to enhance the control techniques carried out by the MCS against *Ae. albopictus*, we evaluated the persistence of 2 formulations of deltamethrin when applied to *Hedera helix* L. (a common ivy). The test consisted of a one-time application of the tested products on sets of 3 replicate plants, plus control plants. During the follow-up period, batches of adult female mosquitoes were periodically placed into the caged plants and checked for mortality. Nine potted *H. helix* plants were purchased from a commercial gardening shop. This broad-leaf plant species was selected because of the propensity of *Ae. albopictus* females to rest in dense vegetation. Densely foliated, small specimens (between 10 and 15 cm tall) were selected to provide uniform internal shaded areas.

¹ Department of Parasitology, Veterinary Faculty, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain.

² Servei de Control de Mosquits, Consell Comarcal del Baix Llobregat, Parc Torreblanca, 08980 Sant Feliu de Llobregat, Spain.

³ Present address: Mikel Bengoa Paulis, C/ San Martín 25, bajo, 20005 San Sebastián, Spain.

⁴ To whom correspondence should be addressed.

The plants had not received any pesticide treatments according to the distributor. However, they were washed thoroughly before being used in the trials.

The formulations used were K-othrine SC25® and Aqua K-othrine® (both manufactured by Bayer Environmental Science, Alcácer, Spain). K-othrine SC25 is a broad-spectrum residual insecticide concentrate formulation designed to be diluted in water for the control of crawling insects in public health. This concentrated suspension formulation contains 2.56% weight/weight (w/w) deltamethrin. The dosage recommended by the manufacturer is 0.0102 g of deltamethrin/m², thus 8 ml of K-othrine SC25 in 1 liter of water can be used to cover 20 m². Aqua K-othrine is an emulsion formulation containing 2.03% w/w deltamethrin. This product is designed for spraying and cold-fogging against flying insects, but can also be used in thermal fogging. As described in the commercial information, it contains proprietary technology (FFAST®) that prevents water evaporation issues. The same concentration of deltamethrin by surface (0.0102 g/m²) was used, so that 10.2 ml of Aqua K-othrine may be used in 1 liter of water to cover 20 m².

Three plants were treated with Aqua K-othrine, 3 with K-othrine SC25, and the remaining 3 plants with tap water as a control. To achieve uniform application, 3 outdoor areas of 20 m² each were established on a piece of empty ground. Dilutions were applied over the area by a hand-operated knapsack sprayer, the Solo™ 423 (Solo Kleinmotoren GmbH, Sindelfingen, Germany) using a fan nozzle. Although the mode of application recommended for Aqua K-othrine is ULV or thermal fogging, it was decided to use a knapsack sprayer to achieve a more homogeneous treatment. The mixture applied to the vegetation did not reach the run-off point and no significant wind was present at application time. Preliminary tests were conducted using water only to calculate the application parameters and the time required to obtain maximum uniformity. Application time was measured using a stopwatch.

Our bioassay method was similar to that described by Xue et al. (2006), which is based on the excised leaf bioassay (Madden et al. 1947, Cilek and Hallmon 2006, Doyle et al. 2009). However, we modified the method as our goal was to offer a whole resting plant to the mosquitoes for a better representation of real-world conditions. If only 1 leaf is used mosquitoes cannot benefit from the darkness and humidity provided by the entire plant, and their contact with the tested substance may be lower. Cages of 30 × 30 × 20 cm were built using metal rods and polyamide screen with a <0.5-mm mesh size. Each plant was placed into a cage and brought indoors to a room with semicontrolled temperature and humidity (24 ± 5°C and 40 ±

10% relative humidity), and natural daylight. Plants were watered by capillarity, using flooding trays placed under the cage. Trays were withdrawn the day before each bioassay and replaced afterwards.

The bioassays took place at 5, 12, 19, 27, and 34 days posttreatment and consisted of introducing twenty 2- to 3-day-old non-blood-fed adult female *Ae. albopictus* into each cage for 24 h. Mosquitoes used were from a local strain reared in the MCS laboratory according to the methodology described by Alarcón-Elbal et al. (2010). Pieces of sliced apple were offered to mosquitoes on the top of each cage as a water and food source. At 24 h all mosquitoes were withdrawn from the cages: living females were captured with a mechanical aspirator, whereas the dead ones were collected from the floor of the cage, the plant leaves, or the plant pot. Shaking the plant was sometimes necessary to collect all individuals. Some unrecovered individuals were counted as dead when parts of the body were found. A total of 900 female mosquitoes were tested, with 300 in the control and 600 in the 2 insecticide formulations.

The variability in the mean mosquito mortality between plants in the same treatment was evaluated using a chi-square test. To detect differences within each insecticide formulation and the control, a 1-way ANOVA was performed using the treatment as the main effect and the percentage of mortality as the dependent variable. Mortality data were previously adjusted using Abbott's formula (1925). A linear time-mortality correlation model was also computed. All statistics were computed using SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc. 2008).

There were no significant differences within treatment or control groups, except for day 12, when control mortality was significantly different among the 3 plants ($P = 0.009$). This homogeneity within treatment groups therefore permitted the influence of individual plants on mortality to be ignored in statistical calculations. The activity of both formulations followed similar decreasing patterns over the 34-day test period (Fig. 1). Aqua K-othrine-treated plants yielded a significantly higher and more durable mortality effect than those treated with K-othrine SC25 up to day 27 (ANOVA, $P < 0.05$). Whereas Aqua K-othrine provided 100% control in the 1st test at day 5 and above 80% at day 12, K-othrine SC25 scored only 88.3% on day 5, dropping to 56.6% by day 12. This relationship was maintained for the rest of the test period. Values at 34 days after application decreased to 37% and 27% mortality respectively, being not significantly different between Aqua K-othrine and K-othrine SC25. In the linear correlation model of the persistence of the insecticide, the R^2 coefficients were 0.928 for Aqua K-othrine, 0.803 for K-othrine SC25,

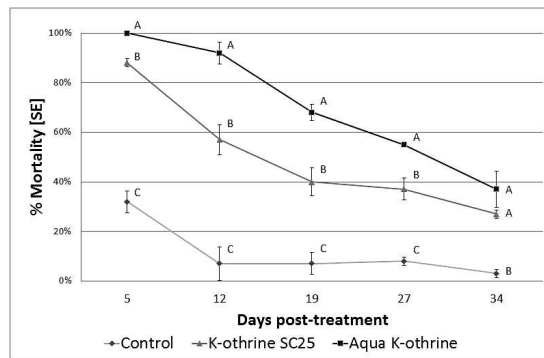


Fig. 1. Mean mortality (mean of 3 replicates) caused by water (control) and K-othrine SC25® and Aqua K-othrine®-treated plants during the test period. Data are expressed in percentage $\pm$ SE. Different letters at same day posttreatment show significant differences using a 1-way ANOVA test ($P < 0.05$).

and 0.416 for the control. The R^2 values for logarithmic correlation model were 0.847 for Aqua K-othrine and 0.838 for K-othrine SC25 (in all cases $P < 0.05$) (Table 1).

In these test conditions the Aqua K-othrine formulation remained effective at $>80\%$ mortality up to 12 days after the application. In contrast, K-othrine SC25 consistently showed lower efficacy throughout the test period. Therefore, Aqua K-othrine should be a better candidate for residual application to plants against *Ae. albopictus*. Since the active ingredient and the concentration were unchanged, the difference between these products could only be attributed to the formulation. Aqua K-othrine is an emulsion in which deltamethrin (an oily substance) is homogeneously distributed in water with the help of emulsifier additives. This technology could account for its better performance, due to a better interfacing between the leaf cuticular waxes and the long-chain alcohol molecules in the droplets. On the other hand, K-othrine SC25 is designed for application on porous, absorbent surfaces.

Rozilawati et al. (2005) obtained 100% mortality when deltamethrin wettable granule was applied at $25\text{mg}/\text{m}^2$ against *Ae. albopictus* for 6 wk on indoor wooden or brick surfaces. However, no

reduction in the natural outdoor population was detected by ovitrap monitoring in that trial, possibly due to ecological factors that prevented mosquito exposure to the active ingredient. A 100% mortality up to 12 wk posttreatment was obtained by Cilek and Hallmon (2006) in an excised leaf bioassay using Suspend™ (4.75% deltamethrin), applied to the point of runoff. A common issue with synthetic pyrethroids is the repellent effect, which prevents mosquitoes from coming into contact long enough to acquire a lethal dose (Chareonviriyaphap et al. 2004, Kongmee et al. 2004). Whereas this effect is not relevant in caged tests, it can be important in natural conditions as mosquitoes can survive by escaping from treated areas due to discomfort. It is important to note that our plants had no appreciable growth, so a reduction in efficacy similar to that observed by Cilek and Hallmon (2006) did not occur. Neither natural nor pesticide-induced defoliation was observed, which is interesting because these formulations are not intended for plant application and phytotoxicity is frequently an issue for such formulations.

If our laboratory results are reproduced in the field, 0.01 g of deltamethrin/ m^2 could provide reasonable control of 80% of the mosquitoes resting in the vegetation for almost 2 wk. Taking into account environmental agents such as direct sunlight on the upper leaf faces, rain, and other atmospheric factors, the concentration would probably have to be increased to achieve similar results in the field (Allan et al. 2009). As a next step, considering that taller, compact plants may be more challenging due to their 3-dimensional structure, other sprayer types should be tested offering more penetration. Hoffmann et al. (2009) demonstrated that sprayers producing large droplet sizes ($200\text{ }\mu\text{m}$) and high air speed at the nozzle discharge ($30\text{ m}/\text{sec}$) are best at penetrating into vegetation.

Residual barrier insecticide application to vegetation is a useful control method for *Ae. albopictus* due to this species' habit of resting within vegetation, commonly below a height of 1.5 m (Bengoa, personal observations). Whereas biocides and application machinery are crucial elements in IVM programs, additional ecological

Table 1. Estimations of linear and logarithmic correlation of the observed mortality.

Treatment	Equation	Model summary			Estimated parameters	
		R^2	F	P	Constant	Slope
Control	Linear	0.416	9.242	0.009	25.741	-0.559
	Logarithmic ¹	0.847	71.807	0.000	0	0
Aqua K-othrine	Linear	0.928	166.508	0.000	48.575	-0.415
	Logarithmic	0.847	71.807	0.000	118.999	-23.813
K-othrine SC25	Linear	0.803	52.828	0.000	39.848	-0.412
	Logarithmic	0.838	67.358	0.000	101.917	-21.669

¹ As the observed mortality contains no positive values, it is not possible to calculate the logarithmic model.

factors derived from target species' behavior will also have to be assessed as one of the key factors in *Ae. albopictus* control programs. As a rule, the width of an insecticide barrier has to be in accordance with the flight range of the target species. The longer the flight range is, the wider the planned insecticide barrier (Madden et al. 1947). This species has a short dispersal range in small mosaic urban areas containing individual houses with fences and gardening, where it has a strong affinity for resting in vegetation. Therefore, narrow and frequent residual barriers on vegetation fences can be an adequate strategy to enhance the efficiency of controlling the Asian tiger mosquito in that environment.

We are especially indebted to the MCS of the Baix Llobregat Council crew for their assistance with treatments and data collection, to Xabier Amenós from Bayer Environmental Science Spain for providing the Aqua K-othrine, and to Nacho de Blas for the statistical analyses. Reviewers of the preliminary manuscript were very helpful with their suggestions.

REFERENCES CITED

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267.
- Alarcón-Elbal PM, Delacour S, Pinal R, Ruiz-Arrondo I, Muñoz A, Bengoa M, Eritja R, Lucientes J. 2010. Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 69:140–148.
- Allan SA, Kline DL, Walker TW. 2009. Environmental factors affecting efficacy of bifenthrin-treated vegetation for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 25:338–346.
- Amoo AO, Xue RD, Qualls WA, Quinn BP, Bernier UR. 2008. Residual efficacy of field-applied permethrin, d-phenothrin, and resmethrin on plant foliage against adult mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 24:543–549.
- Aranda C, Eritja R, Roiz D. 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol* 20:150–152.
- Bohart RM. 1957. *Insects of Micronesia, Diptera: Culicidae*. Volume 12. Honolulu, Hawaii: Bernice P. Bishop Museum. p 57–58.
- Britch SC, Linthicum KJ, Wynn WW, Walker TW, Farooq M, Smith VL, Lothrop HD. 2009. Evaluation of barrier treatments on native vegetation in a southern California desert habitat. *J Am Mosq Control Assoc* 25:184–193.
- Chareonviriyaphap T, Prabaripai A, Bangs MJ. 2004. Excito-repelleny of deltamethrin on the malaria vectors, *Anopheles minimus*, *Anopheles dirus*, *Anopheles swadwongporni*, and *Anopheles maculatus*, in Thailand. *J Am Mosq Control Assoc* 20:45–54.
- Cilek JE, Hallmon CF. 2006. Residual effectiveness of pyrethroid-treated foliage against adult *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* in screened field cages. *J Am Mosq Control Assoc* 22:725–731.
- Cilek JE, Hallmon CF. 2008. Residual effectiveness of three pyrethroids on vegetation against adult *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* in screened field cages. *J Am Mosq Control Assoc* 24:263–269.
- Collantes F, Delgado J. 2011. Primera cita de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) en la Región de Murcia. *Anales de Biología* 33:99–101.
- Dalla Pozza G, Romi R, Majori G. 1994. Source and spreading of *Aedes albopictus* in the Veneto region, Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 10:589–592.
- Delacour-Estrella S, Bravo-Minguet D, Alarcón-Elbal PM, Bengoa M, Casanova A, Melero-Alcibar R, Pinal R, Ruiz-Arrondo I, Molina R, Lucientes J. 2010. Detección de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en Benicàssim. Primera cita para la provincia de Castellón (España). *Bol Soc Entomol Aragonesa* 47:440.
- Doyle MA, Kline DL, Allan SA, Kaufman PE. 2009. Efficacy of residual bifenthrin applied to landscape vegetation against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 25:179–183.
- Eritja R, Escosa R, Lucientes J, Marquès E, Molina R, Roiz D, Ruiz S. 2005. Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges for Spain. *Biol Invasions* 7:87–89.
- Gould EA, Gallian P, de Lamballerie J, Charrel RN. 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* 16:1702–1704.
- Hoffmann WC, Farooq M, Walker TW, Fritz B, Szumlas D, Quinn B, Bernier U. 2009. Canopy penetration and deposition of barrier spray from electrostatic and conventional sprayers. *J Am Mosq Control Assoc* 25:323–331.
- Kongmee M, Prabaripai A, Akkratanakul P, Bangs M, Chareonviriyaphap T. 2004. Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. *J Med Entomol* 41:1055–1063.
- Madden AH, Schroeder HO, Lindquist AW. 1947. Residual spray applications to salt-marsh and jungle vegetation for control of mosquitoes. *J Econ Entomol* 40:119–123.
- Miquel M, Del Rio R, Borrás D, Barceló C, Paredes C, Lucientes J, Miranda MA. 2013. First detection of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the Balearic Islands (Spain) and assessment of its establishment according to the EDC guidelines. *J Eu Mosq Control Assoc* 31:8–11.
- Mitchell CJ. 1995. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin. *J Vector Ecol* 20:44–58.
- Moore CG, Mitchell CJ. 1997. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Dis* 3:329–334.
- Perich MJ, Tidwell MA, Dobson SE, Sardelis MR, Zaglul A, Williams DC. 1993. Barrier spraying to control the malaria vector *Anopheles albimanus*: laboratory and field evaluation in the Dominican Republic. *Med Vet Entomol* 7:363–368.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A. 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370:1840–1846.
- Roiz D, Eritja R, Melero-Alcibar R, Molina R, Marquès E, Ruiz S, Escosa R, Aranda C, Lucientes J. 2007. Distribución de *Aedes (Stegomyia) albopictus*

- (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae) en España. *Bol Soc Entomol Aragonesa* 40:523–526.
- Roiz D, Eritja R, Molina R, Melero-Alcibar R, Lucientes J. 2008. Initial distribution assessment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the Barcelona, Spain, area. *J Med Entomol* 45:347–352.
- Rozilawati H, Lee HL, Mohd Masri S, Mohd Noor I, Rosman S. 2005. Field bioefficacy of deltamethrin residual spraying against dengue vectors. *Trop Biomed* 22:143–148.
- Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schöneberg I, Günther S, Stark K, Frank C. 2010. Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill*. [Internet] 15(40):pii=19677 [accessed October 7, 2010]. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19677>.
- SPSS Inc. 2008. *SPSS 17.0 family for Windows*. Chicago, IL: SPSS Inc.
- WHO [World Health Organization]. 2006. *Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance*. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1. 114 p. Available from World Health Organization, Avenue Appia 20, 1211 Geneva, Switzerland.
- Xue R.-D, Kline DL, Ali A, Barnard DR. 2006. Application of boric acid baits to plant foliage for adult mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 22:497–500.

4.3 First data on resistance to pyrethroids in wild populations of *Aedes albopictus* from Spain.

SCIENTIFIC NOTE

FIRST DATA ON RESISTANCE TO PYRETHROIDS IN WILD POPULATIONS OF *AEDES ALBOPICTUS* FROM SPAIN

MIKEL BENGUA,^{1,5} ROGER ERITJA,² SARAH DELACOUR,¹ MIGUEL ÁNGEL MIRANDA,³ ANTONIO SUREDA⁴
 AND JAVIER LUCIENTES¹

ABSTRACT. The invasive mosquito, *Aedes albopictus*, found in Spain since 2004, is a competent vector of yellow fever, Zika, dengue, and chikungunya viruses among other diseases. Although controversial, the use of adulticiding is a relevant tool for vector control and could be crucial for the management of any possible outbreak of imported diseases. We present the 1st study in Spain on the susceptibility of field populations from Barcelona, Peñíscola, Castellón, and Mallorca of *Ae. albopictus* to several pyrethroids using either bioassays under the World Health Organization methodology and biochemical tests. In the bioassays, the discriminating concentrations were calculated using a local, susceptible laboratory strain. Different susceptibility levels were found for some combinations of populations and products. The biochemical tests carried out by enzymatic analysis supported these results, showing an overexpression of glutathione *S*-transferase activity in 1 population.

KEY WORDS bioassay, biochemical assay, discriminating concentration, pyrethroids, resistance

Since *Aedes albopictus* (Skuse) was first detected in Spain in 2004, the entire Mediterranean coast and the Balearic Islands have been colonized by this species, commonly known as the Asian tiger mosquito (Collantes et al. 2015). In addition to being an invasive species, it is a competent vector of dengue, chikungunya, yellow fever (Paupy et al. 2009), and Zika viruses (Wong et al. 2013). In Europe, it has already proven its vectorial capacity for chikungunya and dengue (ECDC 2016).

According to the World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) manual for vector control, the destruction of breeding spots and the use of larvicides are the most rational methods for combating *Ae. albopictus*, although the use of adulticiding is also recommended in epidemic outbreaks (WHO 2006). Chemical adulticides involve toxicological and ecotoxicological hazards, and could induce resistance in the target population especially if active ingredients are not rotated. The rising of insecticide resistance constitutes a serious problem, as has been evidenced with a related species, *Ae. aegypti* (L.), in several control campaigns (Macoris et al. 2014). Indiscriminate routine

use of adulticides, with poorly executed application methods and use by the general public, may promote resistant populations (Manica et al. 2016).

The information about insecticide resistance by *Ae. albopictus* is quite rare in Europe (Romi et al. 2003, Vontas et al. 2012, Boubidi et al. 2016). To our knowledge, no genetic or biochemical studies have been carried out on *Ae. albopictus*. At a global level, a summary can be found in Vontas et al. (2012). The mosquito susceptibility to insecticides may be altered in 2 ways: by increasing the metabolic production of detoxifying enzymes (esterases, cytochrome P450 oxidases, and glutathione *S*-transferases), or by making the target receptors insensitive (Nauen 2007). In this paper, we report on the resistance of field populations of *Ae. albopictus* to pyrethroid insecticides.

To complete bioassays and enzyme assays, 4 wild populations were compared against a laboratory strain. Our laboratory susceptible strain (S-Lab) was obtained from the metropolitan area of Barcelona and kept at the University of Zaragoza for 6 years (Alarcón-Elbal et al. 2010). The field populations were collected in October 2013 as eggs from various ovitraps in the metropolitan area of Barcelona (Barcelona: 41°25'14"N, 2°01'07.7"E), Peñíscola (Peñíscola: 40°22'05.4"N, 0°23'22.6"E), Castellón (Castellón: 39°59'42.2"N, 0°1'14.5"E), and Bunyola, on the island of Mallorca (Mallorca: 39°40'18.7"N, 2°41'10.2"E). A minimum of 500 eggs were collected for each population, which were reared into adults following the methods described in Alarcón-Elbal et al. (2010). The adults that emerged (F₀) were bloodfed, and the following generation (F₁) was maintained under laboratory conditions (25°C; 70% RH; 12:12 h photoperiod), and only females of

¹ Department of Parasitology, Veterinary Faculty, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain.

² Servei de Control de Mosquits, Consell Comarcal del Baix Llobregat, Parc Torreblanca, 08980 Sant Feliu de Llobregat, Spain.

³ Laboratory of Zoology, University of the Balearic Islands, Palma, Majorca, Spain.

⁴ Area of Biochemistry and Molecular Biology, University of the Balearic Islands, Palma, Majorca, Spain.

⁵ Tiger Mosquito Consultancy, Palma, Majorca, Spain.

Table 1. Knock-down times (min) and mortality percentage at 24 h postexposure of *Aedes albopictus* tested populations to the discriminating concentrations (World Health Organization tube test).¹

Strain	Deltamethrin 0.05%		Permethrin 1%		Cypermethrin 0.1%	
	KDT ₅₀	% mortality	KDT ₅₀	% mortality	KDT ₅₀	% mortality
S-Lab	30.10	100	25.14	100	26.75	100
Barcelona	24.61	100	25.54	100	22.23	93 ²
Peñíscola	27.13	90 ²	28.91	95 ²	25.22	85 ³
Castellón	23.21	100	24.48	98	20.67	90 ²
Mallorca	22.87	99	23.74	100	18.71	99

¹ KDT₅₀, time to knockdown 50% of the tested population.² Possible resistance (between 90% and 98%).³ Resistance (<90%).

3 to 5 days old were used for the bioassays and biochemical assays.

The bioassays for susceptibility to adulticides were carried out according to the World Health Organization (WHO) methodology with official kit tubes (WHO 2013). We used 12 × 15-cm sheets of filter paper that were impregnated with various concentrations of technical-grade deltamethrin, permethrin, and cypermethrin (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) using acetone (2 ml per sheet) and silicone oil (0.66 ml per sheet) as solvents, following the WHOPES method (WHO 2006). Concentrations were expressed as the percentage of active ingredient per unit volume of silicone oil. Five concentrations of each of the insecticides were tested. Control sheets were prepared in the same way, but without any active ingredient. The bioassays were carried out in the laboratory, at a temperature of 25 ± 1°C, RH of 75 ± 5%, and a photoperiod of 12 h of light and 12 h of darkness. The baseline discriminating concentration for each insecticide was determined using the S-Lab susceptible strain.

Under the protocol from WHO, discriminating concentrations can be based on 2 possible criteria: either doubling the lowest concentration that results in a 100% mortality rate, or doubling the LC₉₉ value (lethal concentration that kills 99% of the mosquitoes). The 1st criterion was used in this study to establish our discriminating concentrations, but the results will also be discussed under the 2nd. Four groups of 25 unfed 3- to 5-day-old females from the S-Lab strain were exposed to each of the impregnated paper sheets for 1 h and then transferred to a tube without insecticide where they were fed with a 10% sucrose water solution. The mortality rate at 24 h was determined in these recovery tubes. Likewise, 4 control groups with 25 mosquitoes each were exposed to a sheet without insecticide.

Once the discriminating concentrations were established, 100 female mosquitoes from each field population (4 groups of 25 individuals sucrose-fed, but not bloodfed) were exposed to sheets impregnated with the discriminating concentrations for 1 h, as described. Similarly, 2 groups of 25 mosquitoes from each population were exposed to sheets without

insecticide, as a control. The WHO criteria on susceptibility were used (WHO 2013).

We used the methods recommended by the WHO (WHO 2013) for biochemical assays following the protocol by Brogdon (2011). The values for total protein, P450 monooxygenase (P450), nonspecific esterases (EST), and glutathione *S*-transferases (GST) were determined through spectrophotometry using a BioTek PowerWave XS spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT). For each population 30 nonbloodfed female mosquitoes were individually homogenized.

All the statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 19 for Windows© (IBM Corp., Armonk, NY; released 2010). All the values of mortality in the bioassays have been corrected by the mortalities obtained in the controls. The LC₉₉ values for discriminating concentrations were calculated with a log-probit analysis with 95% confidence intervals. The values from the biochemical assays for the laboratory population and the 4 field populations were compared using an analysis of variance and a post hoc Tukey's test. The results were expressed as an average ± the standard deviation, and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

The discriminating concentrations obtained with the S-Lab population were 0.05% for deltamethrin, 1% for permethrin, and 0.1% for cypermethrin. The LC₉₉ values obtained were 0.0449% (0.0352–0.0628%) for deltamethrin, 0.6913% (0.5490–0.9863%) for permethrin, and 0.1077% (0.0746–0.2050%) for cypermethrin. The mortality data of the field populations (Table 1) suggested a resistance of the Peñíscola population to cypermethrin, and a possible resistance to deltamethrin and permethrin. A possible resistance to cypermethrin was also detected in the Barcelona and Castellón populations. The enzymatic activities are shown in Fig. 1. No significant differences in EST activity were found between the S-Lab population and the field populations (*F* = 2.682, *df* 4, 141; *P* = 0.034). The P450 activity was significantly higher in the Barcelona, Peñíscola, and Castellón populations compared with the S-Lab population (*F* = 21.190, *df* 4, 141; *P* = 0.000). When analyzing GST, the lowest activity was

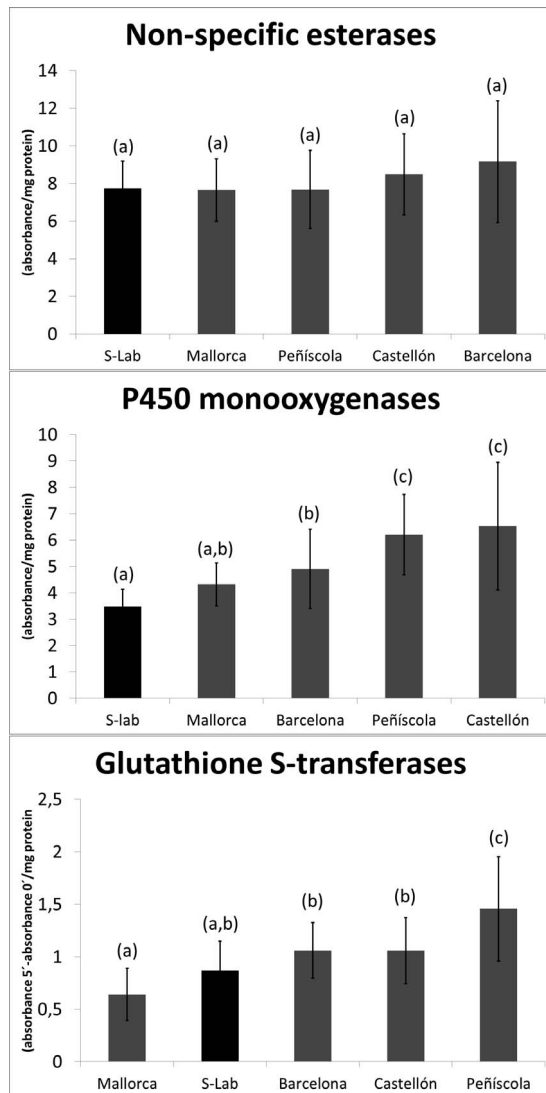


Fig. 1. Mean levels of enzyme activity in the S-Lab and wild *Aedes albopictus* populations, corrected by total protein assay. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$, 1-way ANOVA).

found in Mallorca and the highest in Peñíscola. The latter was significantly higher than the S-Lab population ($F = 23.984$, $df\ 4, 141$; $P = 0.000$).

The criterion used to establish the discriminating concentration should be taken into account when assessing the results and the possibility of resistance. In this study, we used the double of the 1st concentration that achieved 100% mortality. To our knowledge, only 4 published studies have determined the LC_{99} for *Ae. albopictus* against deltamethrin, permethrin, or cypermethrin, but they were not calculated with the European populations (Jirakanjanakit et al. 2007, Chan et al. 2011, Lee et al. 2014, Thanispong et al. 2015). The heterogeneity of LC_{99}

values for deltamethrin (for the cited publications, respectively, and in the same order 0.03%, 0.1%, not tested, 0.0131%), permethrin (0.43%, 0.35%, not tested, 0.5119%), and cypermethrin (not tested, 0.6156%, 0.1185%), combined with a lack of consensus, leads to difficulties in estimating real susceptibility.

Results obtained from biochemical tests are in accordance to those obtained from the bioassays, since GST activity in Peñíscola was significantly higher than in the other populations. The GST activity is the main metabolic mechanism that induces dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) resistance (Ranson and Hemingway 2005). Cross-resistance to DDT and pyrethroids in mosquitoes with sodium channel mutations has been described (Soderlund and Bloomquist 1990). The P450 overexpression present in the Barcelona, Peñíscola, and Castellón populations has been reported also in various pyrethroid-resistant *Ae. albopictus* populations in Malaysia (Chan and Zairi 2013), and cypermethrin-resistant populations in Singapore in combination with an overexpression of EST (Lee et al. 2014). However, no population in this study showed overexpression of EST. In our case, the most likely hypothesis is that the combination of high P450 and GST activities could be responsible for the potential resistance to pyrethroids in the Peñíscola population.

The results of this study highlight the need for an in-depth review of the insecticide resistance of *Ae. albopictus* in Europe. Continuous arrival of viremic travelers makes case-by-case surveillance necessary, including the use of adulticiding as a tool of quickly suppressing local populations of the vector, if necessary (WHO 2006). Restricting the routine use of adulticiding to sensitive and exceptional cases would help prevent resistance development, thus preserving their efficacy in public health cases. Therefore, routine integrated vector management should rely on a diversified strategy based on sustainable larviciding and raising public awareness to eliminate breeding spots on private properties. We have been unable to attempt crosslinking the resistances detected in this study with agricultural or public health treatments, since they do not need to be officially notified. Global forthcoming studies on resistance surveillance might help to reach a consensus on discriminating concentrations as well as to better understand the enzymatic mechanisms involved, and the relationship between bioassays and biochemical tests.

We are grateful to David Borrás, Pedro Alarcón-Elbal, Rodrigo Jerez, and Carlos Barceló for their support with the maintenance of colonies and bioassays. Thanks to Xavier Capó for the technical ability to complete the GST assay in 5 min. We express our gratitude as well to William G. Brogdon for helping us with the detailed laboratory procedures for biochemical assays. A. Sureda was supported by

Instituto de Salud Carlos III, CIBEROBN (CB12/03/30038).

REFERENCES CITED

- Alarcón-Elbal PM, Delacour S, Pinal R, Ruiz-Arrondo I, Muñoz A, Bengoa M, Eritja R, Lucientes J. 2010. Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 69:140–148.
- Boubidi SC, Roiz D, Rossignol M, Chandre F, Benoit R, Raselli M, Tizon C, Cadiou B, Tounsi R, Lagneau C, Fontenille D, Reiter P. 2016. Efficacy of ULV and thermal aerosols of deltamethrin for control of *Aedes albopictus* in Nice, France. *Parasit Vectors* 9:597.
- Brogdon WG. 2011. Introduction to microplate enzyme activity assays. In: Dotson E, ed. *MR4: methods in Anopheles research*. 2nd edition. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. p 200–211.
- Chan HH, Mustafa FF, Zairi J. 2011. Assessing the susceptibility status of *Aedes albopictus* on Penang Island using two different assays. *Trop Biomed* 28:464–470.
- Chan HH, Zairi J. 2013. Permethrin resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and associated fitness costs. *J Med Entomol* 50:362–370.
- Collantes F, Delacour S, Alarcón-Elbal PM, Ruiz-Arrondo I, Delgado JA, Torrell-Sorio A, Bengoa M, Eritja R, Miranda MÁ, Molina R, Lucientes J. 2015. Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004–2014: known distribution and public health concerns. *Parasit Vectors* 8:655.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2016. *Aedes albopictus* [Internet]. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control [accessed April 16, 2017]. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-albopictus.aspx>.
- Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharapit S, Charoenviriyaphap T, Duchon S, Bellec C, Yoksun S. 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003–2005. *J Econ Entomol* 100:545–550.
- Lee RM, Choong CT, Goh BP, Ng LC, Lam-Phua SG. 2014. Bioassay and biochemical studies of the status of pirimiphos-methyl and cypermethrin resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore. *Trop Biomed* 31:670–679.
- Macoris Mde L, Andrighetti MT, Wanderley DM, Ribolla PE. 2014. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 47:573–578.
- Manica M, Cobre P, Rosà R, Caputo B. 2016. Not in my backyard: effectiveness of outdoor residual spraying from hand-held sprayers against the mosquito *Aedes albopictus* in Rome, Italy. *Pest Manag Sci* 73:138–145.
- Nauen R. 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag Sci* 63:628–633.
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11:1177–1185.
- Ranson H, Hemingway J. 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401:226–241.
- Romi R, Toma L, Severini F, Di Luca M. 2003. Susceptibility of Italian populations of *Aedes albopictus* to temephos and to other insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 19:419–423.
- Soderlund DM, Bloomquist JR. 1990. *Pesticide resistance in arthropods*. In: Roush RT, Tabashnik BE, eds. New York, NY: Chapman & Hall. p 79–80.
- Thanispong K, Sathantriphop S, Malaithong N, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. 2015. Establishment of diagnostic doses of five pyrethroids for monitoring physiological resistance in *Aedes albopictus* in Thailand. *J Am Mosq Control Assoc* 31:346–352.
- Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol* 104:126–131.
- WHO [World Health Organization]. 2006. *Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance*. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2016.1. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO [World Health Organization]. 2013. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wong PS, Li Mz, Chong CS, Ng LC, Tan CH. 2013. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2348.

4.4 Resistencias a insecticidas de los principales vectores de dengue, chikungunya y Zika (diptera; culicidae). Implicaciones para España

RESISTENCIAS A INSECTICIDAS DE LOS PRINCIPALES VECTORES DE DENGUE, CHIKUNGUNYA Y ZIKA (DIPTERA, CULICIDAE). IMPLICACIONES PARA ESPAÑA

Mikel Bengoa Paulis^{1,2*}, Roger Eritja^{3,4} & Javier Lucientes¹

¹Departamento de Patología Animal, Sección Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza (España).

²Consultoria Moscard Tigre. * Mallorca@moscardtigre.com.

³Servei de Control de Mosquits, Consell Comarcal del Baix Llobregat, Parc Torreblanca, 08980 Sant Feliu de Llobregat, España.

⁴CREAF, Campus Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Cerdanyola del Vallès, España.

Resumen: Tanto *Aedes albopictus* como *Aedes aegypti* son vectores eficaces de dengue, chikungunya y zika. Desde 2004, *Ae. albopictus* se encuentra establecido en España y se dan las condiciones idóneas para que *Ae. aegypti* también se establezca. A la hora de hacer frente a brotes epidémicos de estas enfermedades, el uso de insecticidas será una herramienta fundamental para reducir rápidamente la población del vector. Algunos *Ae. albopictus* de España presentan resistencias a algunas materias activas adulticidas, y dependiendo de su localidad de origen, las poblaciones de *Ae. aegypti* que lleguen probablemente también sean resistentes. En España el 93 % de los formulados disponibles legalmente para combatirlos contienen únicamente piretroides, reduciéndose mucho la posibilidad de rotación de familias de insecticidas. La vigilancia de las resistencias y la restricción del uso de adulticidas se consideran necesarias.

Palabras clave: Diptera, Culicidae, *Aedes, albopictus, aegypti*, insecticidas, piretroides, resistencias, España.

Resistance to insecticides of the main dengue, chikungunya and zika vectors (Diptera, Culicidae). Implications for Spain

Abstract: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* are efficient vectors of dengue, chikungunya and zika. Since 2004 *Ae. albopictus* has been established in Spain, and conditions are suitable for the establishment of *Ae. aegypti* as well. During epidemic outbreaks, the use of insecticides will be a key tool to achieve a rapid reduction of the vector's population. Some *Ae. albopictus* from Spain present resistance to some adulticides, as many of the *Ae. aegypti* populations worldwide. In Spain, 93% of the products officially allowed to control adult mosquitoes contain only pyrethroids, which reduces the possibility of rotation between groups of insecticides. Resistance surveillance and limitation in the use of adulticides are considered necessary.

Key words: Diptera, Culicidae, *Aedes, albopictus, aegypti*, insecticides, pyrethroids, resistances, Spain.

Introduction

Aedes albopictus (Skuse, 1895) y *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), más conocidos como mosquito tigre y mosquito de la fiebre amarilla, respectivamente, han tenido un gran éxito en su expansión global (Kraemer *et al.*, 2015b). *Ae. albopictus*, originario del sudeste asiático, comenzó su expansión gracias al comercio internacional de neumáticos usados (Moore & Michell, 1997), mientras que *Ae. aegypti*, originario del África sub-sahariana, lo hizo anteriormente en barcos de esclavos (Powel & Tabachnick, 2013). Este éxito se ha debido a la plasticidad de estos mosquitos para adaptarse a nuevos territorios y a su marcado carácter antropofílico, ya que no solo prefieren tomar sangre de seres humanos sino que, además, nosotros mismos les propiciamos sus focos de cría (Faraji *et al.*, 2014). Ambos mosquitos aedinos son vectores de enfermedades víricas humanas como el dengue, el chikungunya, la fiebre amarilla (frente a la cual *Ae. albopictus* ha demostrado su capacidad vectorial únicamente en condiciones experimentales) o el Zika como se ha verificado recientemente (Wong *et al.*, 2013; ECDC, 2016a; ECDC, 2016b).

La Organización Mundial de la Salud recomienda el control integrado de los vectores, que en el caso de estos mosquitos urbanos comienza por la eliminación de sus focos de cría. Los programas de control de brotes epidémicos de dengue, chikungunya o Zika tienen como diana a estas dos especies de mosquito, ya que no existen vacunas para su tratamiento. En estos casos o en situaciones donde su elevada población pueda propiciar la transmisión autóctona de enfer-

medades, la OMS también recomienda el uso de adulticidas (OMS, 2009). En varios países, principalmente de América del Sur, el uso de adulticidas ha sido ampliamente utilizado por lo que la exposición de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* a insecticidas ha sido rutinaria y continuada, generando finalmente resistencias (Rodríguez *et al.*, 2007; Ranson *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2016). Las resistencias a insecticidas han contribuido a fracasos en el control de epidemias como en Martinica (Marcombe *et al.*, 2009), Guyana Francesa (Dus-four *et al.*, 2011) o Sao Paulo (Brasil) (Macoris *et al.*, 2014).

Distribución de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* en España y sus implicaciones sanitarias

Aedes albopictus se detectó por primera vez en Sant Cugat del Vallès (Barcelona) en 2004 (Aranda *et al.*, 2006). Desde entonces, se ha extendido a lo largo de, prácticamente, toda la costa mediterránea, Baleares y en una población del País Vasco y Aragón (Collantes *et al.*, 2015). En España, no ha intervenido de momento como vector en la transmisión de ninguna enfermedad, aunque sí lo ha hecho en otros países de Europa como en Francia, Italia y Croacia (Rezza *et al.*, 2007; Schmidt-Chanasit *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2013; Delisle *et al.*, 2015), quedando patente su capacidad vectorial. Ante el riesgo que supone la presencia de este vector en España, el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSSI) ha creado el plan nacional de preparación y respuesta frente a

enfermedades transmitidas por vectores (MSSSI, 2016). El Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES), perteneciente al MSSSI, también ha emitido informes de situación y evaluación del riesgo frente a dengue (CCAES, 2013) y chikungunya (CCAES, 2015a), además de varios protocolos sobre el Zika (CCAES, 2016b; CCAES, 2016b), en los que se evalúa la interacción de casos vírémicos importados con *Ae. albopictus* y de éstos con el resto de la población.

Actualmente, *Ae. aegypti* no se encuentra establecido en territorio español, pero hasta la primera mitad del siglo XX se le consideraba abundante en la costa Mediterránea (Eritja *et al.*, 2005) y responsable de brotes de fiebre amarilla y de dengue (Pittaluga, 1928; Nájera, 1943; Angolotti, 1980). Los últimos episodios autóctonos de fiebre amarilla en España tienen lugar entre 1870 y 1880 (Nájera, 1943). No se conoce por qué esta especie dejó de estar presente en la Península Ibérica a partir de la segunda mitad del siglo XX, pero las medidas llevadas a cabo para la erradicación del paludismo o el incremento de la salubridad en los municipios y en los barcos, que podrían haber actuado como fuentes de reintroducción de ejemplares, son causas citadas a menudo (Eritja *et al.*, 2005). Desde hace 25 años, *Ae. aegypti* está en plena expansión de su distribución (Jansen & Beebe, 2010). A diferencia de *Ae. albopictus*, no soporta inviernos muy fríos aun-que, según los modelos, podría asentarse en España (Kraemer *et al.*, 2015b).

La posibilidad de re-introducción de *Ae. aegypti* en España es muy real. Aunque ejemplares de este mosquito pudieran ser introducidos de manera accidental desde cualquier zona donde esté actualmente establecido, se entiende que aquellos países con los que España mantiene unas comunicaciones comerciales más estrechas serían los lugares de origen más probables. Por lo tanto Portugal desde Madeira (Margari-ta *et al.*, 2006), Cabo Verde, Senegal o Mauritania serían posibles puntos de origen en una entrada por las Islas Canarias (CCAES, 2013). También hay que tener en cuenta las relaciones comerciales y de tráfico de personas entre España y América del Sur, de donde procedían los *Ae. aegypti* que causaron el brote de dengue en Madeira (Alves *et al.*, 2013).

Encaminadas a la detección temprana de *Ae. aegypti* en España, existen dos iniciativas: el Programa Nacional de vigilancia entomológica en aeropuertos y puertos frente a vectores importados de enfermedades infecciosas exóticas del MSSSI (CCAES, 2015b) y la plataforma de ciencia ciudadana mediante dispositivos móviles MosquitoAlert: (www.mosquitoalert.com).

Esta última inicialmente apuntaba únicamente al mosquito tigre pero, a partir de 2016, incorporó la detección de *Ae. aegypti*.

Situación de resistencias a insecticidas

Según el Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (IRAC), la resistencia a insecticida es "un cambio hereditario en la sensibilidad de una población de plagas que se refleja en el fracaso repetido de un producto para alcanzar el nivel de control esperado cuando se usa de acuerdo con la recomendación de etiqueta para esa plaga".

Basándonos en artículos de revisión, como los de Ranson *et al.* (2010) o el de Smith *et al.* (2016), podemos ver que se han realizado muchos más estudios de resistencia a insecticidas con *Ae. aegypti* que con *Ae. albopictus* (87 frente a 18

en Ranson; 75 frente a 25 en Smith) y que existen más poblaciones resistentes de *Ae. aegypti* que de *Ae. albopictus* (90% frente a 28% según Smith). Esto tal vez pueda deberse a que *Ae. aegypti* ha estado involucrado en más brotes epidémicos y por lo tanto más expuesto a biocidas. Gracias a la base de datos geolocalizados de resistencias a insecticidas (PopBio) de VectorBase (<https://www.vectorbase.org/popbio>) se puede ver que las poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes se encuentran principalmente en América del Sur, mientras que las poblaciones de *Ae. albopictus* resistentes se encuentran en el sudeste asiático, aunque esto puede ser debido a la escasez de estudios realizados sobre *Ae. albopictus* en América del Sur.

Por lo tanto, en un escenario hipotético de introducción en España de *Ae. aegypti* provenientes de América del Sur, el riesgo de que les acompañase la resistencia a algún insecticida sería elevado (Tabla I). Otra posible vía de entrada sería desde Madeira, donde se han descrito resistencias de *Ae. aegypti* a DDT, Permetrina y Deltametrina (Seixas *et al.*, 2012), con dos mutaciones en genes *kdr* asociados a la resistencia de esta especie a insecticidas (Seixas *et al.*, 2013). Sin embargo, no deben generalizarse las resistencias de *Ae. aegypti* en cada país, ni en Madeira, ya que no se encuentran extendidas por todo el territorio ni son homogéneas. En función de las localidades de procedencia de las poblaciones introducidas en España, se tendrían unos perfiles de resistencia diferentes.

En cuanto a resistencias de *Ae. albopictus*, en España se ha descrito una población de Peñíscola resistente a Cipermetrina, además de presentar resistencias moderadas a Deltametrina y Permetrina. Otras dos poblaciones (Barcelona y Castejón) han presentado resistencias moderadas a Cipermetrina (Bengoa *et al.*, en preparación). En Europa se han publicado únicamente tres artículos de resistencia a insecticidas, en los que se vieron poblaciones susceptibles a Permetrina y Deltametrina en Francia, Italia y en Grecia (Romi *et al.*, 2003; Vontas *et al.*, 2012; Boudibi *et al.*, 2016). Las resistencias observadas en España urgen a profundizar en su estudio y extensión así como a fomentar un uso más racional de los adulticidas.

Insecticidas en España

El escenario de las actuaciones frente a mosquitos está dentro del reglamento 528/2012 (EC, 2012), que sustituye a la Directiva 98/8/CE (EC, 1998), por lo que se deben utilizar productos biocidas, no fitosanitarios, ya que los mosquitos no afectan a los vegetales (EC, 2009, Artículo 2.1). Únicamente las materias activas insecticidas (tipo de producto 18 dentro de los biocidas) pueden ser empleadas en los formulados para el control de los mosquitos. Los formulados comercializados en España han de estar inscritos en el Registro Oficial de Plaguicidas (ROP) según el RD 3349/83 (Registro Nacional) o en el Registro Oficial de Biocidas (ROB) según el Reglamento (UE) nº 528/2012 (Registro Europeo), ambos gestionados por la Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación del MSSSI. Respecto a los tipos de uso de estos formulados existen dos tipos: uso por el público en general o uso por personal especializado.

En el supuesto de que se quiera erradicar mediante adulticidas una población de *Ae. aegypti* tras una detección temprana como ocurrió en Holanda (Scholte *et al.*, 2010), o para combatir brotes epidémicos en los que *Ae. albopictus* actúe como vector, se utilizarían los productos registrados de uso profesional (personal especializado) frente a insectos voladores.

Tabla I. Resistencias de *Aedes aegypti* frente a insecticidas descritas en América del Sur
 (**: posible resistencia; ***: resistencia confirmada)

Familia	Materia Activa	País	Situación	Autor
Organoclorados	DDT	Colombia	***	Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2010 Fonseca-Gonzalez <i>et al.</i> , 2011 Ocampo <i>et al.</i> , 2011 Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2014
		Costa Rica	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Cuba	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Jamaica	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Nicaragua	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Panamá	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Perú	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Venezuela	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Costa Rica	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Cuba	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
Organofosforados	Clorpirifós	Jamaica	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Perú	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Panamá	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
	Fenitrotión	Brasil	***	Macoris <i>et al.</i> , 2014
		Colombia	***	Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2010 Ocampo <i>et al.</i> , 2011 Fonseca-Gonzalez <i>et al.</i> , 2011
		Guyana Francesa	***	Dusfour <i>et al.</i> , 2011
	Malatión	Brasil	***	Macoris <i>et al.</i> , 2014
		Venezuela	***	Alvarez <i>et al.</i> , 2013
	Temefos	Colombia	***	Ocampo <i>et al.</i> , 2011 Conde <i>et al.</i> , 2015
Carbamatos	Bendiocarb	Brasil	***	Macoris <i>et al.</i> , 2014
	Propoxur	Colombia	***	Ocampo <i>et al.</i> , 2011 Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2010
Fosforotioatos	Metil-pirimifós	Colombia	**	Conde <i>et al.</i> , 2015
		Cuba	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Jamaica	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Panamá	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Perú	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
	Betacypermetrina	Colombia	***	Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2014
		Cuba	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Jamaica	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Nicaragua	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Panamá	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
Piretroides	Cipermetrina	Brasil	***	Cunha <i>et al.</i> , 2005 Macoris <i>et al.</i> , 2007 Lima <i>et al.</i> , 2011 Macoris <i>et al.</i> , 2014
		Costa Rica	***	Calderón-Arquedas & Trovo, 2016
	Deltametrina	Brasil	***	Macoris <i>et al.</i> , 2014 Maciel-de-Freitas <i>et al.</i> , 2014 Chapadense <i>et al.</i> , 2015 Fernandes <i>et al.</i> , 2016
		Costa Rica	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Colombia	***	Calderón-Arquedas & Trovo, 2016 Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2014
		Cuba	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Guyana Francesa	***	Dusfour <i>et al.</i> , 2011 Faucon <i>et al.</i> , 2015
		Jamaica	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Nicaragua	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Perú	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
	Etofenprox	Venezuela	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Alvarez <i>et al.</i> , 2013		
	Lambdacyhalotrina	Colombia	***	Fonseca-Gonzalez <i>et al.</i> , 2011 Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2010 Fonseca-Gonzalez <i>et al.</i> , 2011 Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2014 Ocampo <i>et al.</i> , 2011
		Costa Rica	**	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Cuba	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
	Permetrina	Perú	***	Rodriguez <i>et al.</i> , 2007
		Brasil	***	Macoris <i>et al.</i> , 2007
		Colombia	***	Fonseca-Gonzalez <i>et al.</i> , 2011 Maestre-Serrano <i>et al.</i> , 2014

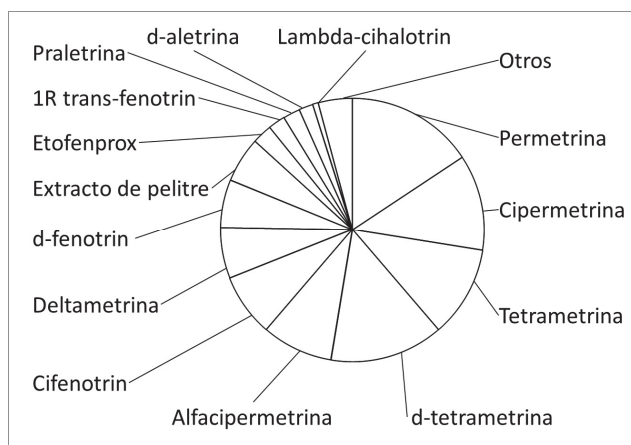


Fig 1. Materias activas presentes en los formulados inscritos en el Registro Oficial de Plaguicidas que sean de uso profesional y para insectos voladores. Otros: Otras materias activas no piretroides. Fuente: MSSSI.

En la actualidad existen 189 productos registrados con estas características (todos en el ROP a la espera de ser incluidos en el ROB), de los cuales el 93% contienen exclusivamente piretroides (Figura 1). Esta fuerte predominancia de insecticidas de una única familia, sobre la que ya se han detectado resistencias, es preocupante dado que limita las herramientas disponibles. Además, muchas poblaciones de *Ae. aegypti* que podrían ser introducidas en España, ya han desarrollado resistencias frente a piretroides.

Generación de resistencias a insecticidas y manejo de las mismas

Las resistencias que presenta *Ae. aegypti* en América del Sur han sido generadas por un uso indiscriminado del larvicida temephos, del DDT y de piretroides, combinado con un escaso control de la calidad de los tratamientos (Fernández-Salas *et al.*, 2015). Además, los tratamientos intensivos realizados desde la vía pública con maquinaria de Ultra Bajo Volumen montada sobre un vehículo, método normalmente utilizado en este continente, difícilmente alcanzan el interior de las viviendas donde las hembras de *Ae. aegypti* descansan, generando concentraciones sub-letales que fomentan la aparición de resistencias a insecticidas (Perich *et al.*, 2000). Este tipo de operativas deberían ser profundamente revisados (Esu *et al.*, 2010; Boubidi *et al.*, 2016).

El objetivo del control integrado de plagas frente a *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* debería de ser el abandono de la lucha química (Cornell *et al.*, 2016), reservando ésta únicamente a brotes epidémicos (Maciel-de-Freitas *et al.*, 2014), y centrar las acciones rutinarias de control en la eliminación mecánica de los focos de cría y en el uso racional de larvicidas de tipo biológico, más seguros frente a la aparición de resistencias (OMS, 2009). En el marco de un control integrado de plagas a gran escala (AW-IPM), nuevos métodos de control como la Técnica del Insecto Esteril (SIT), o la técnica del Insecto Incompatible (IIT), mediante poblaciones inoculadas con *Wolbachia*, pueden ser las estrategias del futuro en la lucha contra mosquitos vectores de enfermedades (Fernández-Salas *et al.*, 2015). Otras técnicas novedosas, aún en desarrollo, prometen buenos resultados, como el uso de Ovitrapas Autocidas (AGO) frente a *Ae. aegypti*. Estos dispositivos redujeron en un 80% la población de mosquitos, en Puerto Rico, tras colocar tres trampas en cada casa (Barrera *et al.*,

2014). Igualmente, la auto-diseminación de larvicidas (piriproxifen) es otra prometedora técnica (Snetselaar *et al.*, 2014), la cual redujo en un 96- 98% la emergencia de adultos de *Ae. aegypti* en recipientes no tratados en zonas poco pobladas de Brasil, con una densidad de 1,53 puntos de diseminación de larvicida/hectárea (Abad-Franch *et al.*, 2017). Todas estas técnicas, sin embargo, requieren de una aplicación rutinaria a lo largo de la estación de cría para mantener las densidades de mosquitos adultos a un nivel bajo. Hasta que estos métodos de control estén implementados y se generalicen a nivel de país, hay que tener presente que la única herramienta frente a brotes epidémicos de dengue, chikungunya o Zika es el uso de adulticidas, ya que no hay otro método que permita una reducción cuasi instantánea de poblaciones elevadas de mosquitos adultos. Por lo tanto, es imprescindible una correcta gestión de los mismos, haciendo rotaciones de materias activas disponibles y tratamientos en mosaico, combinados con una vigilancia rutinaria de las resistencias generadas (Maciel-de-Freitas *et al.*, 2014).

Bibliografía

- ABAD-FRANCH, F., E. ZAMORA-PEREA & S.L.B. LUZ 2017. Mosquito-Disseminated Insecticide for Citywide Vector Control and Its Potential to Block Arbovirus Epidemics: Entomological Observations and Modeling Results from Amazonian Brazil. *PLoS Med*, **14**(1): e1002213.
- ALVAREZ, L.C., G. PONCE, M. OVIEDO, B. LÓPEZ & A.E. FLORES 2013. Resistance to malathion and deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from western Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, **50**: 1031-1039.
- ALVES, M.J., P.L. FERNANDES, F. AMARO, H. OSÓRIO, T. LUZ, P. PARREIRA, G. ANDRADE, L. ZÉ-ZÉ & H. ZELLER 2013. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Eurosurveillance*, **18**(6) pii: 20398.
- ANGOLOTTI, E. 1980. La fiebre amarilla. Historia y situación actual. La fiebre amarilla en la Barcelona de 1821. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, **54**: 89-102.
- ARANDA, C., R. ERITJA & D. ROIZ 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**: 150-152.
- BARRERA, R., M. AMADOR, V. ACEVEDO, R.R. HEMME & G. FELIX 2014. Sustained, area-wide control of *Aedes aegypti* using CDC autocidal gravid ovitraps. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **91**: 1269-1276.
- BELLINATO, D. F., P. F. VIANA-MEDEIROS, S. C. ARAÚJO, A. J. MARTINS, J. B. LIMA & D. VALLE 2016. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. *BioMed Research International*, **2016**: 8603263.
- BOUBIDI, S.C., D. ROIZ, M. ROSSIGNOL, F. CHANDRE, R. BENOIT, M. RASELLI, C. TIZON, B. CADIOU, R. TOUNSI, C. LAGNEAU, D. FONTENILL & P. REITER 2016 Efficacy of ULV and thermal aerosols of deltamethrin for control of *Aedes albopictus* in nice, France. *Parasites & Vectors*, **9**(1): 597.
- CALDERÓN-ARGUEDAS, O. & A. TROYO 2016. Evaluación de la resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de la Región Caribe de Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **68** (1): 95-104.
- CCAES 2013. Evaluación del riesgo de introducción y circulación del virus de dengue en España. (http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/evRiDe_5_13.pdf) [consultado el 19-01-2017].
- CCAES 2015a. Evaluación Rápida del Riesgo de transmisión de fiebre por virus de Chikungunya en España. (<http://www>.

- msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/docs/ERR_Chikungunya_27.08.2015.pdf) [consultado el 19-01-2017].
- CCAES 2015b. Resumen de los resultados sobre la vigilancia entomológica en aeropuertos y puertos frente a vectores importados de enfermedades infecciosas exóticas, y vigilancia de potenciales vectores autóctonos de dichas enfermedades. (http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/activPreparacionRespuesta/doc/Resumen_Vigilancia_entomologica_2014.pdf) [consultado el 19-01-2017].
- CCAES 2016a. Información para viajeros sobre el virus Zika. (https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/docs/DIPTICO_VIRUS_ZIKA_MSSSI_0206-.pdf) [consultado el 19-01-2017].
- CCAES 2016b. Información Técnica a profesionales Sanitarios. (<https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/zika/informacion/home.htm>) [consultado el 19-01-2017].
- CHAPADENSE, F.G.G., E.K.K. FERNANDES, J.B.P. LIMA, A.J. MARTINS, L.C. SILVA, W.T. DA ROCHA, A.H. DOS SANTOS & P. CRAVO 2015. Phenotypic and genotypic profile of pyrethroid resistance in populations of the mosquito *Aedes aegypti* from Goiânia, Central West Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **48**: 607-609.
- COLLANTES, F., S. DELACOUR, P. ALARCÓN-ELBAL, I. RUIZ-ARRONDO, J. DELGADO, A. TORRELL-SORIO, M. BENGUA, R. ERITJA, M.A. MIRANDA, R. MOLINA & J. LUCIENTES 2015. Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004–2014: known distribution and public health concerns. *Parasites & Vectors*, **8**: 655.
- CONDE, M., L.I. ORJUELA, C.A. CASTELLANOS, M. HERRERA-VARELA, S. LICASTRO & M.L. QUINONES 2015. Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomedica*, **35**: 43-52.
- CORNEL, A.J., J. HOLEMAN, C.C. NIEMAN, Y. LEE, C. SMITH, M. AMORINO, K.K. BRISCO, R. BARRERA, G.C. LANZARO, F.S. MULLIGAN 2016. Surveillance, insecticide resistance and control of an invasive *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) population in California. *F1000Research*, **5**: 194.
- CUNHA M.P. DA, J.B.P. LIMA, W.G. BROGDON, G.E. MOYA, D. VALLE 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**: 441-444.
- DELISLE, E., C. ROUSSEAU, B. BROCHE, I. LEPARC-GOFFART, G. L'AMBERT, A. COCHET, C. PRAT, V. FOULONGNE, J.B. FERRÉ, O. CATELINOIS, O. FLUSIN, E. TCHERNONOG, I.E. MOUSSION, A. WIEGANDT, A. SEPTFONS, A. MENDY, M.B. MOYANO, L. LAPORTE, J. MAUREL, F. JOURDAIN, J. REYNES, M.C. PATY & F. GOLLIOT 2015. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Eurosurveillance*, **20**(17): pii=21108.
- DUSFOUR, I., V. THALMENS, P. GABORIT, J. ISSALY, R. CARINCI & R. GIROD 2011. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **106**(3): 346-352.
- EC [PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO] 1998. Directiva de 16 de febrero de 1998, relativa a la comercialización de biocidas. *Diario oficial de la Unión Europea*.
- EC [PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO] 2009. Directiva de 21 de Octubre de 2009, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. *Diario oficial de la Unión Europea*.
- EC [PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO] 2012. Reglamento del 22 de mayo de 2012 relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. *Diario oficial de la Unión Europea*.
- ECDC 2016a. *Aedes aegypti*. <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/pages/aedes-aegypti.aspx#C3>; [consultado el 19-01-2017].
- ECDC 2016b. *Aedes albopictus*. <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-albopictus.aspx> [consultado el 19-01-2017].
- ERITJA, R., R. ESCOSA, J. LUCIENTES, E. MARQUES, D. ROIZ & S. RUIZ 2005. Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges in Spain. *Biological Invasions*, **7**: 87-97.
- ESU, E., A. LENHART, L. SMITH & O. HORSTICK 2010. Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Tropical Medicine & International Health* **15**(5): 619-631.
- FARAJI, A., A. EGIZI, D.M. FONSECA, I. UNLU, T. CREPEAU, S.P. HEALY & R. GAUGLER 2014. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**(8): e3037.
- FAUCON, F., I. DUSFOUR, T. GAUDE, V. NAVRATIL, F. BOYER, F. CHANDRE, P. SIRISOPA, K. THANISPOONG, W. JUNTARAJUMNONG, R. POUPARDIN, T. CHAREONVIRIYAPHAP, R. GIROD, V. CORBEL, R. REYNAUD & J.-P. DAVID 2015. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing, 2015. *Genome Research*, **25**: 1347-1359.
- FERNÁNDEZ-SALAS, I., R. DANIS-LOZANO, M. CASAS-MARTÍNEZ, A. ULLOA, J. G. BOND, C. F. MARINA, T. LOPEZ-ORDÓÑEZ, A. ELIZONDO-QUIROGA, J. A. TORRES-MONZÓN & E.E. DÍAZ-GONZÁLEZ 2015. Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. Review Article. *Antiviral Research*, **124**: 30-42.
- FONSECA-GONZÁLEZ, I., M.L. QUINONES, A. LENHART & W.G. BROGDON 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science*, **67**: 430-437.
- JANSEN, C.C. & N.W. BEEBE 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infection*, **12**(4): 272-279.
- KRAEMER M.U.G., M.E. SINKA, K.A. DUDA, A.Q.N. MYLNE, F.M. SHEARER, O.J. BRADY, J.P. MESSINA, C.M. BARKER, C.G. MOORE, R.G. CARVALHO, G.E. COELHO, W. VAN BORTEL, G. HENDRICKX, F. SCHAFFNER, G.R.W. WINT, I.R.F. ELYAZAR, H.J. TENG & S.I. HAY 2015a. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific Data*, **2**:150035.
- KRAEMER M.U.G., M.E. SINKA, K.A. DUDA, A.Q.N. MYLNE, F.M. SHEARE, C.M. BARKER, C.G. MOORE, R.G. CARVALHO, G.E. COELHO, W. VAN BORTEL, G. HENDRICKX, F. SCHAFFNER, I.R.F. ELYAZAR, H.J. TENG, O.J. BRADY, J.P. MESSINA, D.M. PIGOTT, T.W. SCOTT, D.L. SMITH, W. WINT, N. GOLDING & S.I. HAY 2015b. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*, **4**: e08347.
- LIMA, E.P., M.H. PAIVA, A.P. DE ARAÚJO, E.V. DA SILVA, U.M. DA SILVA, L.N. DE OLIVEIRA, A.E. SANTANA, C.N. BARBOSA, C.C. DE PAIVA NETO, M.O. GOULART, C.S. WILDING, C.F. AYRES & M.A. DE MELO SANTOS 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*, **4**(5): doi:101186.
- MACIEL-DE-FREITAS, R., F.C. AVENDANHO, R. SANTOS, G. SYLVESTRE, S.C. ARAÚJO, J.B.P. LIMA, A.J. MARTINS, G.E. COELHO & D. VALLE 2014. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PLoS One*, **9**: e92424.
- MACORIS M.D.D., M.T.M. ANDRIGHETTI, V.C.G. OTRERA, L.R. DECARVALHO, A.L. CALDAS & W.G. BROGDON 2007. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**: 895-900.
- MACORIS M.D.D., M.T.M. ANDRIGHETTI, D.M. WANDERLEY & P.E. RIBOLLA 2014. Impact of insecticide resistance on the field

- control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **47**(5): 573-578.
- MAESTRE-SERRANO, R., G. REY, J. DE LAS SALAS, C. VERGARA, L. SANTACOLOMA, S. GOENAGA, SERGIO, & M.C. CARRASQUILLA 2010. Estado de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a insecticidas en Atlántico (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, **36**(2): 242-248.
- MAESTRE-SERRANO, R., D. GÓMEZ-CAMARGO, G. PONCE-GARCÍA & A.E. FLORES 2014. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean region. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **116**: 63-73.
- MARCHAND, E., C. PRAT, C. JEANNIN, E. LAFONT, T. BERGMANN, O. FLUSIN, J. RIZZI, N. ROUX, V. BUSSO, J. DENIAU, H. NOEL, V. VAILLANT, I. LEPARC-GOFFART, C. SIX, & M.C. PATY 2013. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Eurosurveillance*, **18**(50): pii=20661.
- MARCOMBE, S., A. CARRON, F. DARRIET, M. ETIENNE, P. AGNEW, M. TOLOSA, M.M. YP-TCHA, C. LAGNEAU, A. YÉBAKIMA & V. CORBEL 2009. Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**(5): 745-751.
- MARGARITA Y., A.J. SANTOS-GRÁCIO, I. LENCASTRE, A.C. SILVA, T. NOVO, A.P.G. ALMEIDA & M.J. BISCOITO 2006. Mosquitos de Portugal: primeiro registo de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera, Culicidae) na Ilha da Madeira. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **13**: 59-61.
- MOORE, C.G. & C.J. MITCHELL 1997. *Aedes albopictus* in the United States: Ten-Year Presence and Public Health Implications. *Emerging Infectious Diseases*, **3**(3): 329-334.
- MSSSI 2016. Plan nacional de preparación y respuesta frente a enfermedades transmitidas por vectores. Parte I: Dengue, Chikungunya y Zika https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/DocsZika/Plan_Nac_enf_vectores_20160720.pdf [consultado el 19-01-2017].
- NÁJERA, L. 1943. Los aedinos españoles y el peligro de la Fiebre Amarilla. *Graellsia*, **1**(1): 29-35.
- Ocampo, C.B., M.J. SALAZAR-TERREROS, N.J. MINA, J. M. CALLISTER & W. BROGDON 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trópica*, **118**(1): 37-44.
- OMS 2009. *Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 160 pp.
- PERICH, M.J., G. DAVILA, A. TURNER, A. GARCÍA & M. NELSON 2000. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. *Journal of Medical Entomology*, **37**: 541-546.
- PITTALUGA, G. 1928. *El problema de la Fiebre Amarilla. Medicina de los Países Cálidos*. 5-25.
- POWELL J.R. & W.J. TABACHNICK 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**(1): 11-17.
- RANSON, H., J. BURHANI, N. LUMJUAN & W.C. BLACK 2010. Insecticide Resistance in Dengue Vectors, *TropIKA.net*, **1**: [12].
- REZZA, G., L. NICOLETTI, R. ANGELINI, R. ROMI, A.C. FINARELLI, M. PANNING, P. CORDIOLI, C. FORTUNA, S. BOROS, F. MAGURANO, G. SILVI, P. ANGELINI, M. DOTTORI, M.G. CIUFOLINI, G.C. MAJORI & A. CASSONE 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in temperate region. *Lancet*, **370**: 1840-1846.
- RODRÍGUEZ, M.M., J.A. BISSET & D. FERNÁNDEZ 2007. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **23**: 420-429.
- ROMI, R., L. TOMA, F. SEVERINI & M. DI LUCA 2003. Susceptibility of Italian populations of *Aedes albopictus* to temephos and to other insecticides. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **19**(4): 419-423.
- SCHMIDT-CHANASIT, J., M. HADITSCH, I. SCHONEBERG, S. GUNTHER, K. STARK & C. FRANK 2010. Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Eurosurveillance*, **15**(40): 3-4.
- SEIXAS, G., P. SALGUEIRO, A.C. SILVA, M. CAMPOS, C. SPENASSATTO, M. REYES-LUGO, M.T. NOVO, P.E. MARTINS-RIBOLLA, J.P. SOARES DA SILVA-PINTO & C.A. SOUSA 2013. *Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal): genetic variation of a recently introduced dengue vector. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**(1): 3-10.
- SEIXAS, G. 2012. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas. Tesis Doctoral. Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa, 123 pp.
- SMITH, L.B., S. KASAI & J.G. SCOTT 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **133**(1): 1-12.
- SNETSelaar, J., R. ANDRIESEN, R.A. Suer, A.J. OSINGA, B.G.J. KNOLS & M. FARENHORST 2014. Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, **7**: 200.
- VONTAS, J., E. KIOULOS, N. PAVLIDI, E. MOROU, A. DELLA TORRE & H. RANSON 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **104**(2): 126-131.
- WONG, P.S.J., M. LI, C.S. CHONG, L.C. NG & C.H. TAN. 2013. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **7**(8): e2348.

5. DISCUSIÓN

Desde 2004 la presencia del mosquito invasor *Ae. albopictus* en los municipios españoles no ha hecho sino aumentar, principalmente a lo largo de la costa mediterránea (Collantes et al., 2015). Tanto su plasticidad climatológica como su adaptación al entorno antropogénico han sido las claves de su éxito (Faraji et al., 2014). Las problemáticas asociadas a esta especie se pueden concentrar en dos áreas: su incidencia médica como vector de enfermedades como el dengue, el chikungunya o el Zika entre otras (ECDC 2016 a, b, c), y las molestias causadas por su picadura.

En el escenario español actual, donde de momento no se han dado casos de transmisión autóctona de arbovirosis, la principal problemática causada por *Ae. albopictus* es la pérdida de calidad de vida de la ciudadanía causada por sus picaduras. Aunque no es tan antropofílico como *Ae. aegypti*, el hospedador preferido sobre el que se alimentan las hembras de *Ae. albopictus* somos los seres humanos (Sullivan et al., 1971), principalmente en entornos urbanos (84% sobre humanos frente al 20% en zonas rurales) (Valerio et al., 2010). En Barcelona incluso se determinó que el 100% de la sangre ingerida por las hembras analizadas provenía de humanos. (Muñoz et al., 2011). Las molestias que causa son motivo de alarma social y queja por parte de los ciudadanos, los cuales sufren una disminución de su calidad de vida, y han de modificar los usos de espacios de su vivienda como el jardín, la piscina o la terraza (Abramides et al., 2013). En Italia el 31%-54% de las personas encuestadas en un estudio consideraron al *Ae. albopictus* como el responsable de no poder disfrutar de sus actividades al aire libre (Carrieri et al., 2008). Su comportamiento agresivo al picar, con una presión constante sobre las personas, es el principal motivo para que éstas busquen soluciones (Healy et al., 2014), ya que la percepción de la población frente a la problemática del mosquito tigre se centra principalmente en su agresividad en las picaduras, y no tanto en su capacidad vectorial (Baldacchino et al., 2017).

Sin embargo no hay que olvidar la capacidad vectorial de *Ae. albopictus*, que cuenta en su historial varios episodios de transmisión autóctona en Europa (ver Anexo). La llegada de ciudadanos en fase virémica junto con la abundancia de este vector en algunas zonas de España implica que la probabilidad de un brote autóctono sea moderada-alta (González et al., 2017; Salazar et al., 2018). Hay que recordar que los casos importados pueden provenir tanto desde fuera de la Unión Europea como desde otros países comunitarios donde se esté dando transmisión autóctona de arbovirus, como los brotes de chikungunya de Italia en 2017 (ECDC 2017b) o el brote de dengue en Madeira en 2012-2013 (ECDC 2014). Dado que no existen vacunas contrastadas frente a estas arbovirosis, el control integrado de *Ae. albopictus* se hace indispensable para reducir el riesgo de un episodio local. Ello se ha traducido en la redacción de planes de contingencia para el tratamiento médico y entomológico de casos importados de arbovirosis transmisibles por el nuevo vector en España (ASPC 2015; MSSSI, 2016) como se verá más adelante.

El enfoque del Control Integrado de Vectores (CIV) es el enfoque idóneo y más racional para hacer frente a *Ae. albopictus* según la OMS, el ECDC, y la EMCA. Dos de las herramientas principales de este CIV frente a *Ae. albopictus* son la concienciación ciudadana para eliminar los focos de cría y los tratamientos larvicidas con productos biológicos. Sin embargo, la acción cívica no siempre es eficaz por la necesidad de participación de toda la ciudadanía (Abramides et al., 2011). La gran variedad de acúmulos de agua antropogénicos así como la cultura del agua en España (acumulación para regar en tiempo de sequía), propician la multiplicación de *Ae. albopictus* originados en estos puntos principalmente en entornos periurbanos (Collantes et al., 2015). En el área pública, los tratamientos larvarios de imbornales con larvicidas biológicos, han de ser continuados, sistemáticos y generalizados durante toda la temporada de actividad del *Ae. albopictus*, aunque resultan tratamientos costosos para los municipios, responsables últimos del control de las zonas públicas (Baldacchino et al., 2017; Guzzetta et al., 2017). Es evidente que ambas actuaciones, realizadas de forma sistemática, repercutirían en la reducción preventiva, sostenible y sistemática de las poblaciones del mosquito tigre y una mejora en nuestra calidad de vida. Además, mantener densidades poblacionales de *Ae. albopictus* bajas reduciría el riesgo de una posible transmisión vectorial. Ante un escenario así, la eliminación de focos de cría mediante tratamientos larvarios de urgencia en zonas públicas o mediante campañas de sensibilización en el ámbito privado, no reduciría de una manera rápida y drástica la presencia de adultos.

Es en estas situaciones, donde la población de *Ae. albopictus* es tan elevada que cause alarma social y donde se podrían dar casos de transmisión vectorial (OMS, 2006), en donde los tratamientos adulticidas podrían ser empleados, ya que es la única herramienta disponible en la actualidad para conseguir una reducción rápida y efectiva de la presencia de *Ae. albopictus* en un área determinada. Pero el uso de adulticidas no es una solución sostenible a largo plazo, ya que continuamente se han de realizar tratamientos debido a su baja persistencia. Estos tratamientos conllevan además riesgos tóxicos y ecotoxicológicos, diversas restricciones legales y normativas, así como la posible inducción de resistencias, que deben de tenerse en cuenta a la hora de hacer una valoración de su uso. A nivel doméstico, las molestias causadas por este mosquito pueden propiciar el uso masivo de biocidas de acceso libre al público entre la población no formada (Abramides et al., 2013), que realiza aplicaciones poco efectivas (Manica et al., 2016a) y que podrá contribuir en la aparición de resistencias.

A la hora de realizar tratamientos adulticidas, en esta memoria de tesis se han evaluado los dos tipos de tratamientos más empleados y recomendados por las organizaciones internacionales: volumétricos y de impregnación. Cada tipo de tratamiento tiene sus características, que han de ser evaluadas en cada situación real mediante una inspección previa realizada por personal técnicamente cualificado. Tres son las principales diferencias entre estos tipos de tratamiento. En primer lugar, la persistencia de la mortalidad causada, que es baja en los tratamientos volumétricos al ser intervenciones de choque; en segundo lugar, el área en que se interviene, más grande en el caso del tratamiento volumétrico por su propia naturaleza; y en tercer lugar, las connotaciones de seguridad pública, que exigen mayores precauciones en medios habitados cuando se aplica volumétricamente a causa de las influencias atmosféricas y el menor control sobre el alcance de la propia maquinaria.

El escenario, previamente valorado, será el principal criterio a la hora de decidir qué tipo de tratamiento se ha de emplear. Por ejemplo, en un espacio público amplio como los parques municipales, donde los puntos de cría sean fácilmente detectables interrumpiendo la emergencia de nuevos adultos, sería posible prescindir de aplicaciones de larga persistencia. En este escenario interesaría un rápido efecto de choque, por lo que un tratamiento ULV montado sobre un vehículo puede ser la opción idónea debido a la capacidad técnica de tratar grandes extensiones. Sin embargo, una vez elegido este método habrá que tener en cuenta los factores ambientales, puesto que como se ha visto en el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis, condiciones climáticas adversas pueden disminuir la eficacia de los tratamientos volumétricos o provocar la deriva del producto al exterior de la zona tratada con el consiguiente riesgo de toxicidad, puesto que es imposible la contención de la nube insecticida. También hay que tener en cuenta que los tratamientos volumétricos afectan principalmente a los mosquitos que están activos en ese momento, por lo que se tendrán que realizar los tratamientos en sus momentos de mayor actividad. Como hemos visto en el punto 1.2.1.2, la actividad de *Ae. albopictus* tiene un pico a primeras horas de la mañana y otro más intenso en las últimas horas diurnas del día. Aun así, tratamientos ULV nocturnos también han resultado eficaces (Farajollahi et al., 2012). Por todo ello, y teniendo en cuenta las características urbanas de *Ae. albopictus*, los tratamientos volumétricos contra esta especie muy probablemente quedarían limitados a ataques de choque en descampados, parques, cementerios u otras zonas no residenciales que puedan ser acotadas.

Si por el contrario durante la inspección previa se ha detectado una zona reducida con una elevada presencia de adultos de *Ae. albopictus*, considerado un *Hot Spot*, se impondría preferentemente el tratamiento por impregnación. Los *Ae. albopictus* adultos prefieren descansar entre la vegetación densa, que crea un microhábitat sombrío y húmedo, donde difícilmente los tratamientos volumétricos pueden penetrar. Los tratamientos de impregnación de vegetación confieren una mayor persistencia lo cual garantiza que las siguientes generaciones de mosquitos serán en gran parte neutralizadas, aun no habiendo podido suprimir los puntos de cría larvarios. Los tratamientos en zonas de vegetación densa además se degradan menos con el lixiviado por lluvia y con la radiación ultravioleta, principales factores que afectan a la estabilidad química de la materia activa insecticida. Estas actuaciones son cada vez más empleadas de manera privada (Trout et al., 2007; Manica et al., 2016a) y también en brotes de arbovirus, como en el brote de 2017 de chikungunya en Italia mediante impregnación con Etofenprox (ECDC 2017b). Como punto negativo estructural, la prolongada persistencia de los adulticidas es un potente sistema de selección de individuos menos susceptibles a estos productos, favoreciendo así la aparición de poblaciones resistentes.

En resumen, las aplicaciones volumétricas (ULV) son programadas para tratar rápidamente áreas de grandes dimensiones, con sus inconvenientes en cuanto a seguridad y su baja persistencia, mientras que las impregnaciones residuales se realizan de manera localizada (casa por casa) siendo eficaces a nivel particular durante largos periodos de tiempo pero no efectivas necesariamente a nivel comunitario. La preferencia de *Ae. albopictus* a descansar en la vegetación posiblemente sea el motivo por el que los tratamientos de impregnación han tenido mejor resultado que los tratamientos ULV en estudios comparativos llevados a cabo en Francia (Boudibi et al., 2016).

En Europa se han llevado a cabo pocos estudios sobre tratamientos volumétricos adulticidas frente a *Ae. albopictus*, ya que este tipo de actuaciones únicamente está recomendado en última instancia. Aun así, los estudios publicados anteriormente corroboran las conclusiones obtenidas. En el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis se ha evaluado tanto la mortalidad directa causada por tratamientos ULV sobre hembras de *Ae. albopictus* enjauladas como la mortalidad secundaria causada por la vegetación tratada. El uso de Aqua K-othrine® (2,03% de Deltametrina), con una dosificación de 1 g de Deltametrina/hectárea y aplicada mediante una maquinaria ULV montada sobre vehículo era capaz de provocar una mortalidad del 100% a mosquitos enjaulados a 25 metros de distancia en condiciones atmosféricas óptimas, lo que indica la capacidad de realizar con éxito un tratamiento de choque rápido y de grandes extensiones con esta metodología de aplicación. Esto confirma la revisión por la OMS de este formulado (OMS, 2006c), según la cual es posible alcanzar mortalidades superiores al 86% en mosquitos enjaulados a 50 metros. En nuestro estudio, la mortalidad secundaria causada por vegetación tratada a 20 metros causó una mortalidad máxima del 85%, pero únicamente 5 horas después del tratamiento, lo que indica la reducida persistencia lograda con este tipo de tratamientos, por lo que las poblaciones rápidamente se recuperarán si los focos de cría no han sido retirados.

Además del informe citado de la OMS, únicamente se ha encontrado una referencia sobre tratamientos ULV con Deltametrina frente a *Ae. albopictus* (Boudibi et al., 2016). En ese estudio los autores compararon la eficacia de tratamientos mediante ULV montado sobre vehículo y mediante termonebulización portátil, ambos empleando el formulado Aqua K-othrine® a una dosificación de 1 gr/hectárea, similar a la de nuestro trabajo. La medición de la eficacia se realizó mediante la comparación de la población (con trampas BG-Sentinel y Ovitrampas) 5 días antes y 5 días después de los tratamientos. No registraron una reducción de la población de mosquitos con los tratamientos ULV sobre vehículo, aunque sí observaron una reducción estimada superior al 90% con los tratamientos de termonebulización. Los autores concluían que los tratamientos ULV montados sobre vehículo no alcanzaron los lugares de descanso de *Ae. albopictus*, mientras que los tratamientos de termonebulización sí lo habían hecho al ser portátiles y más manejables. Esto coincide con nuestras conclusiones, donde hemos discutido la menor capacidad de las aplicaciones en ULV para penetrar en la vegetación de descanso de *Ae. albopictus*. Hay que recordar que las altas mortalidades registradas con tratamientos ULV a 25 metros se midieron sobre mosquitos enjaulados en campo abierto, fuera de ningún tipo de cobertura vegetal. En esta memoria de tesis únicamente se ha evaluado la repercusión de los tratamientos por impacto de choque directo, al entender con las condiciones experimentales heterogéneas y con la imposibilidad de retirar todos los focos de cría, la evaluación de la densidad de población mediante muestreo diario no hubiese sido totalmente fiable.

Se han realizado también estudios sobre tratamientos volumétricos adulticidas frente a *Ae. albopictus* con otras materias activas. En un trabajo llevado a cabo en EEUU con tratamientos nocturnos de un formulado de 5% Fenotrina, 1% Praletrina y 5% de Pbo aplicada mediante ULV montada sobre un vehículo, se comparó la reducción de la población general con trampas BG-Sentinel ante un único tratamiento (a una dosificación de 86,2 g de formulado/hectárea), con la realización de dos tratamientos separados uno o dos días (a una dosificación de 42,7 g de formulado/hectárea) (Farajollahi et al., 2012). Concluyeron que dos tratamientos ULV consecutivos durante la noche eran más efectivos, reduciendo el 85% de la población de *Ae. albopictus*. Con este mismo formulado y método de aplicación se alcanzó una mortalidad superior al 99% en mosquitos enjaulados a 91 metros de distancia (Farajollahi y Williams 2013).

En un estudio llevado a cabo en Roma se empleó un formulado con 8% Permetrina, 1,5% de Pelitre y 2,64% de Pbo aplicado mediante una maquinaria de Bajo Volumen, el cual redujo comparativamente un 80-87% las capturas de *Ae. albopictus* en trampas pegajosas tras el segundo tratamiento (Caputo et al., 2015), lo que coincide con el estudio citado en el párrafo anterior acerca de la conveniencia de repetir los tratamientos para conseguir una reducción real de la población.

También en Roma se evaluó la combinación de tratamientos adulticidas y larvicidas (Caputo et al., 2016). Por un lado se determinó la mortalidad directa causada por un único tratamiento adulticida sobre mosquitos enjaulados provocando mortalidades inferiores al 70% a los 20 metros, lo cual es inferior a los resultados obtenidos en nuestros estudios. Por otro lado, apenas se observó una reducción de la población de *Ae. albopictus*, recuperándose rápidamente los índices previos seguramente debido a baja persistencia de los tratamientos ULV. En conjunto, la población de *Ae. albopictus* de la zona tratada (con larvicidas y adulticidas) sí disminuyó respecto a una zona control, principalmente durante el pico poblacional, aunque podrían haber influido otros factores ambientales propios de cada zona.

De nuestros trabajos, al igual que de los estudios publicados, se desprende que la eficacia de los tratamientos adulticidas volumétricos por ULV puede ser muy elevada pero tiende a ser heterogénea debido a las influencias no controlables del medio ambiente. Por ello, resulta interesante la propuesta de realizar múltiples aplicaciones antes que un único tratamiento.

No podemos pronunciarnos sobre la discusión referente a eficacia de aplicaciones nocturnas, cuando los *Ae. albopictus* adultos no están activos, ya que realizamos toda la experimentación aquí presentada durante el día. No son pocos los autores, sin embargo, que indican que el tratamiento nocturno puede ser igualmente eficaz, ya que los mosquitos se encuentran igualmente descansando y pueden ser impactados por las gotas del producto o por la persistencia que mantiene. La eficacia de los tratamientos adulticidas en estos estudios fue muy heterogénea, al igual que hemos contemplado en nuestro caso.

La persistencia de los tratamientos de impregnación sobre vegetación frente a *Ae. albopictus* ha sido evaluada en el artículo 4.2 de la presente memoria de tesis. En nuestro estudio se determinó que dos formulados, con la misma materia activa (Deltametrina), con la misma dosificación ($0,0102 \text{ g/m}^2$) y aplicados mediante la misma maquinaria de pulverización, causaban una mortalidad diferente a lo largo del tiempo, posiblemente por el tipo de formulación (coadyuvantes) que favorecían la adhesión de la materia activa a la cutícula de la planta y la protegían de la degradación. Con el formulado Aqua K-othrine® se obtuvieron mortalidades del 70% a los 19 días, lo que posibilita realizar tratamientos perimetrales de la vegetación con una eficacia duradera. Asimismo, los resultados de mortalidad fueron más constantes entre sí que los obtenidos mediante aplicaciones volumétricas, sugiriendo una mayor fiabilidad en el control resultante de las impregnaciones.

Varios estudios han verificado la eficacia de los tratamientos de impregnación de la vegetación con Deltametrina frente a *Ae. albopictus*, citados en el artículo 4.2 de la presente memoria de tesis (Rozilawati et al., 2005; Cilek y Hallmon, 2006). Los tratamientos de impregnación de la vegetación con Deltametrina, como parte del CIV, han sido eficaces a la hora de reducir drásticamente poblaciones *Ae. albopictus* de zonas donde previamente eran muy abundantes (*Hot spots*) (Unlu et al., 2016). Además de Deltametrina, principalmente se han evaluado tratamientos perimetrales con Lambda-cialotrina y Bifentrin, los cuales han sido eficaces frente a *Ae. albopictus* durante periodos de 5 a 9 semanas (Trout et al., 2007; Doyle et al., 2009; Li et al., 2010; Muzari et al., 2017).

Los tratamientos perimetrales de la vegetación son ampliamente empleados por empresas de control de plagas en EEUU frente a *Ae. albopictus* (Trout et al., 2007) y también por el público en general que puede adquirir estos productos adulticidas en centros de jardinería o en grandes superficies comerciales. En un estudio llevado a cabo en Roma, se evaluó la efectividad de este tipo de tratamientos en jardines privados mediante el uso de un formulado de uso doméstico (15% Permetrina, 2,5% Tetrametrina y 5% Pbo) aplicado con un pulverizador de presión previa manual también de uso doméstico (Manica et al., 2016a). Se utilizaron ovitrampas adhesivas y trampas BG para monitorizar la población previa y posterior a los tratamientos. Al día siguiente del tratamiento se observó una reducción de la población del 86% dentro del jardín tratado, pero la población se recuperó rápidamente en los siguientes días, por lo que se realizó un segundo tratamiento a los 7 días, consiguiendo una reducción de la población inicial del 31% a los 7 días de este segundo tratamiento. Concluyeron que la aplicación continuada de productos insecticidas conllevaba también que los dueños de los jardines practicasen uso exagerado y despreocupado de estos productos químicos, lo que podría suponer una rápida generación de resistencias además de los demás riesgos evidentes. Estas conclusiones ponen de manifiesto por un lado la facilidad con la que el público en general tiene acceso a adulticidas y el bajo coste que tiene realizar tratamientos perimetrales, aunque sean ineficaces. De hecho, es común encontrar en grandes superficies productos para aplicar barreras perimetrales frente al mosquito tigre, presentados en un pulverizador manual que proporciona una penetración del insecticida en la masa arbustiva muy reducida.

La impregnación de la vegetación se suele realizar con maquinaria de pulverización, pero en el caso especial en que las aplicaciones volumétricas con ULV son dirigidas hacia la vegetación, y realizadas a corta distancia, se pueden impregnar también las hojas de las plantas, uniendo en teoría la rapidez y facilidad técnica de realizar tratamientos con un vehículo, el efecto de choque de los tratamientos volumétricos y la persistencia residual de los tratamientos de impregnación. En un estudio llevado a cabo en Italia, se comparó la eficacia de dos técnicas de impregnación de la vegetación (ULV y pulverización) y dos insecticidas (Etofenprox y Cipermetrina) para controlar al *Ae. albopictus* (Marini et al., 2015). Este autor obtuvo una reducción del 100% con ambos métodos de aplicación y ambos insecticidas al día siguiente de cada tratamiento, pero según avanzó el tiempo (7 días y 14 días) se constató la mayor persistencia obtenida con los tratamientos de pulverización frente a los ULV. Sus conclusiones confirmaban lo expuesto aquí en el sentido de la pérdida de eficacia por deriva en los tratamientos ULV que implicó menores cantidades de insecticida adherido a la vegetación. La presión de la máquina pulverizadora, por otra parte, permitía alcanzar zonas más profundas de la vegetación. Un estudio realizado en Niza (Francia) durante brotes epidémicos concluyó que los tratamientos ULV sobre vehículo no tienen un impacto significativo sobre la población de mosquitos, y que las impregnaciones con maquinaria manual sobre *Hot Spots*, son métodos más recomendables (Boudibi et al., 2016).

Como se ha venido exponiendo en la presente memoria de tesis, compartimos en gran medida estas mismas conclusiones, dado que la impregnación de la vegetación se adapta mejor a la biología de *Ae. albopictus*, proporciona resultados más constantes y reproducibles, depende menos de las condiciones ambientales y presenta menores riesgos toxicológicos, aunque por definición incrementa el riesgo de selección de resistencias transmisibles genéticamente. Ante esta evidencia, y considerando que las aplicaciones adulticidas son un estándar a menudo indiscriminado en la industria del control de plagas, estudiamos también el estado de las resistencias en poblaciones españolas de *Ae. albopictus*.

Uno de los aspectos que más puede influir en el éxito de un tratamiento con adulticidas, tanto volumétrico como de impregnación, es la resistencia generada por las aplicaciones previas de esos mismos productos en poblaciones determinadas de la especie diana. Es por ello que estas resistencias deben de ser objeto de vigilancia rutinaria, con especial énfasis en las regiones donde se haya documentado un uso previo masivo de sustancias químicas adulticidas, o bien exista un historial de aplicaciones fitosanitarias o de otro tipo que pudieran haber incidido sobre *Ae. albopictus*.

Si se detectasen resistencias, como las que sugieren nuestros resultados (expuestos en el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis), se deberían de implementar localmente protocolos de gestión, como la rotación a otras materias activas que, por supuesto, estuviesen registradas como adulticidas (Tabla 9) o el uso de nuevos métodos de control. Las resistencias son hereditarias y la elevada variabilidad genética, como la descrita en poblaciones españolas de *Ae. albopictus* por Delacour et al. (2017) es un punto de partida preocupante para gestionar las resistencias, dado que la mayor heterogeneidad genética general también sugiere un mayor abanico de elementos de resistencia seleccionables.

Piretroides tipo 1	Piretroides tipo 2	Piretoides Non-ester	Piretrinas Naturales
Permetrina d-Tetrametrina Tetrametrina d-Fenotrin Praletrina d-Aletrina	Cipermetrina α -Cipermetrina Cifenotrin Deltametrina Trans-fenotrin	Etofenprox	Pelitre

Tabla 9: Materias Activas incluidas en los formulados incluidos en el Registro Oficial de Biocidas (ROB)

A la hora de plantear una vigilancia rutinaria de la resistencia de *Ae. albopictus* a insecticidas, sería necesario consensuar las concentraciones discriminantes, ajustándolas con una cepa criada en el laboratorio que no haya estado en contacto con insecticidas, como por ejemplo la cepa de la Universidad de Zaragoza empleada para este trabajo y que puede ser considerada como la cepa de referencia en España. Varios han sido los autores que han fijado concentraciones discriminantes para varias materias activas frente a *Ae. albopictus* (Jirakanjanakit et al., 2007; Chan et al., 2011; Lee et al., 2014; Thanispong et al., 2015; Rahim et al 2017) además del artículo 4.3 de la presente memoria de tesis, aunque los resultados en todos los casos son muy heterogéneos. Los dos criterios definidos por la OMS para calcular estas concentraciones (el doble de la primera que obtenga el 100% de mortalidad o el doble de la LC₉₉, ambas obtenidas con una cepa susceptible) añaden más dificultad al consensuar este valor. Hay que tener en cuenta que los valores obtenidos con ambos criterios podrían indicar concentraciones discriminantes muy distintas como de hecho ha sucedido en nuestro trabajo.

Nuestras concentraciones discriminantes fijadas mediante el doble de la concentración que causó primeramente el 100% de la mortalidad en la cepa de Zaragoza y expuestas a 4 poblaciones de campo fueron Deltametrina 0.05%, Permetrina 1% y Cipermetrina 0.1%. Si hubiésemos empleado el otro criterio de la OMS, el doble de la LC₉₉ obtenida con la cepa de Zaragoza, éstas concentraciones hubiesen sido diferentes (Deltametrina 0.09%, Permetrina 1,38% y Cipermetrina 0.22%). Con estas concentraciones discriminantes más altas seguramente no se hubiesen llegado a describir poblaciones resistentes, siendo éste el motivo de la importancia de consensuar dichas concentraciones. Idealmente, sería de esperar que la OMS fijase unas concentraciones discriminantes para *Ae. albopictus* frente al mayor número posible de materias activas, definiendo también un único criterio de elección para calcularlas.

En nuestros resultados, la población de *Ae.albopictus* muestreada en Peñíscola ha resultado ser resistente a cipermetrina y posiblemente resistente a deltametrina y permetrina, mientras que las poblaciones de Barcelona y Castellón han presentado una posible resistencia a cipermetrina. No existe información sobre el volumen y la naturaleza de los impactos químicos previos que sufren o han sufrido históricamente estos mosquitos en unas regiones muy determinadas y que pudieran explicar la presencia de estas resistencias, con lo que los protocolos de prevención de las resistencias deberían ser muy generales en sus principios y muy locales en su aplicación. Huijben et al. (2017) identificó una posible resistencia de *Ae. albopictus* en el Baix Llobregat frente a Deltametrina, mientras que en nuestro caso era susceptible. Esta diferencia puede deberse a los 3 años de diferencia de captura de individuos de campo, a que tal vez las poblaciones no fuesen exactamente las mismas o a las diferentes metodologías de medición empleadas (botella del CDC y tubo de la OMS).

Pese a que en el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis hemos encontrado un estrecho paralelismo entre los resultados de los bioensayos y los ensayos enzimáticos para las diferentes poblaciones españolas, otros autores han obtenido discrepancias entre estos dos sistemas de medición (Marcombe et al., 2014; Das y Dutta 2014). Hay que tener en cuenta que estas enzimas intervienen además en la detoxificación de otras sustancias tóxicas para el organismo (contaminación, barbitúricos, alcohol y otros) por lo que una sobreexpresión de las mismas podría estar relacionada con otros agentes. *Ae. albopictus*, al desarrollar su ciclo vital tan cerca de las actividades humanas, en nuestras propias ciudades, puede verse afectado por un gran número de tóxicos que alteren su metabolismo. Por lo tanto el papel de estas enzimas en la resistencia de *Ae. albopictus* a Piretroides no está del todo claro (Smith, Kasai y Scott 2016).

El uso incorrecto, rutinario y masivo de adulticidas (también en el ámbito doméstico) resulta en pérdidas de eficacia y aumento del riesgo de aparición de resistencias (Manica et al., 2016a). Las poblaciones de *Ae. aegypti* en América del Sur ya han demostrado ser resistentes a muchas de las materias activas empleadas, por lo que una posible reintroducción de este mosquito vendría acompañada de problemas de este tipo. Se sugiere que debido al uso indiscriminado de adulticidas en Sudamérica, generalmente mal aplicados y sin una verificación de calidad, ha desembocado en la generalización de resistencias en las poblaciones de *Ae. aegypti* (Fernandez-Salas et al., 2015). Este es un ejemplo directamente homologable y que debería de ser tenido en cuenta para evitar un mal uso de los adulticidas frente a *Ae. albopictus*, una especie muy similar. Las resistencias generadas por *Ae. aegypti* han resultado ya en ineficacias notorias de tratamientos adulticidas durante brotes epidémicos (Marcombe et al., 2009; Dusfour et al., 2011; Macoris et al., 2014; Vazquez-Prokopec et al., 2017).

Un ejemplo muy actual de este uso incorrecto y masivo de adulticidas en España puede ser la impregnación sistemática de focos de cría urbanos como los imbornales con pinturas biocidas que incluyen Piretroides en su composición. Estas campañas municipales pueden convertir una ciudad entera en un potente seleccionador de mosquitos resistentes, existiendo además el agravante de que los mosquitos simplemente sean repelidos y desplacen la búsqueda de focos de cría a las propiedades privadas, rehuendo el control público. De esta manera los imbornales públicos estarán libres de larvas, pero en las propiedades privadas criarán con mayor densidad *Ae. albopictus* resistentes a estos piretroides. Otro ejemplo, a nuestro parecer muy contraproducente, son las instalaciones fijas de pulverización de insecticidas a unas horas determinadas, publicitados en otros países como Italia, los cuales pueden fomentar la selección de poblaciones resistentes debido a la aplicación continuada. La venta de adulticidas en grandes superficies (colocados incluso en las cabeceras de la línea de caja), cuya etiqueta hace referencia directamente a los tratamientos perimetrales frente a mosquito tigre, también es otro ejemplo de un uso masivo e indiscriminado. En este caso, el formulado (Acetamiprid 0,2%, D-trans-tetrametrina 0,1%) viene presentado en una botella con una pistola pulverizadora manual incorporada, y su bajo precio (de 5 a 8€) lo hace accesible a todo el público.

Como se ha visto, los tratamientos adulticidas tienen una especial importancia para abordar situaciones de riesgo sanitario en sus diferentes niveles. Para hacer frente a estos escenarios de casos importados o autóctonos de arbovirosis, cada país ha desarrollado unas guías de actuación, siendo el plan de contingencia francés el más desarrollado en Europa (MASSDF 2015). El plan organiza vigilancias epidemiológicas y entomológicas, facilita la rápida coordinación entre las investigaciones y las actividades de control de mosquitos, permite la anticipación de los recursos necesarios en caso de brote y proporciona herramientas reguladoras. En el plan de contingencia francés se recomienda el uso de tratamientos adulticidas mediante termonebulización (en las propiedades privadas) y ULV (en el resto de la zona de intervención) con Deltametrina. En todos los casos en los que se ha dado transmisión vectorial de estas enfermedades en Europa se han realizado tratamientos adulticidas, aunque normalmente no se ha publicado exactamente cómo se han realizado (ver Anexo de la presente memoria de tesis). Estos tratamientos, junto a otras medidas de control como tratamientos larvarios, comunicación puerta a puerta, y otros factores externos no controlados (reducciones naturales de la población o aumento del uso de repelentes) han contribuido muy probablemente a la resolución de los brotes, aunque en pocos casos se ha descrito la metodología de aplicación, los formulados empleados o la medición de la eficacia.

El preocupante número de casos virémicos llegados a España durante la temporada de actividad de *Ae.albopictus* pone de manifiesto la necesidad de una intervención rápida y coordinada (Gonzalez et al 2017). A raíz de la repercusión del virus del Zika a principios de 2016, el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSSI) redactó el Plan Nacional de Preparación y Respuesta frente a Enfermedades transmitidas por Vectores (MSSSI, 2016), y anteriormente las Administraciones catalanas lideradas por la Generalitat ya habían confeccionado el primer Protocolo autonómico de Arbovirosis (ASPC, 2015). En estos protocolos apenas se habla de tratamientos adulticidas, recomendando una revisión y ampliación, si procede, de las medidas de control vectorial, en especial las de control adulticida a partir del nivel de riesgo 3 (detección de 1 caso autóctono probable y/o confirmado). Las acciones de control vectorial recaerían sobre los servicios de control de plagas, o empresas de control de plagas si están entrenadas en aplicaciones de control de mosquitos y sujetas a un control de eficacia y un control calidad externa, aunque no se especifica cómo se evalúa a una empresa en estos aspectos.

Por desgracia, estos planes no suelen abordar propuestas y protocolos concretos de intervención, que parecen dejarse al criterio municipal o empresarial. Tampoco suelen abordar el tema de las resistencias a insecticidas generadas por *Ae. albopictus*, limitándose a recomendar el uso de productos registrados, lo cual es completamente obvio y prescindible. Teniendo en cuenta la cantidad de información, los conocimientos previos de la especie diana y la tecnificación necesaria para el éxito de las intervenciones (entre las que se pueden encontrar los tratamientos adulticidas), es realmente preocupante que no se haya creado a nivel nacional una guía explícita de tratamientos adulticidas. La importancia sanitaria de *Ae. albopictus*, debería de ser un aliciente para potenciar la formación técnica de las empresas de control de plagas, la cual actualmente es alarmantemente deficitaria a nivel general.

El objetivo de la presente memoria de tesis ha sido aumentar los conocimientos sobre los tratamientos adulticidas frente a *Ae. albopictus*, evaluando diferentes aspectos de cada uno de ellos con la intención de conocer sus capacidades y limitaciones, así como sus consecuencias. En este sentido también se ha aportado información sobre el estado de las resistencias a insecticidas de algunas poblaciones de España, tema no estudiado hasta el momento de su publicación.

A través de la discusión de esta información, que hemos confrontado con los escasos trabajos existentes incluso a nivel global, esperamos optimizar el uso de los tratamientos adulticidas como herramientas de control, tanto a nivel particular como público. Si bien se trata de una metodología algo denostada y poco recomendada, con multitud de riesgos y problemas, en ciertas circunstancias seguirá siendo una herramienta única e imprescindible. Consideramos por ello importante que las pocas veces en que los tratamientos adulticidas sean indicados, se puedan realizar de la forma más correcta y protocolizada. Esperamos también que los planes nacionales y autonómicos, así como los programas de formación e información empresariales, puedan contemplar de manera más detallada -con prudencia pero sin complejos- el uso de tratamientos adulticidas para hacer frente a brotes epidémicos y otras situaciones de alarma social mediante una correcta valoración de cada escenario de aplicación.

6. CONCLUSIONES

1. Gracias a la metodología de ensayo de mosquitos enjaulados, se ha podido verificar la eficacia de choque de los tratamientos de 1 g de Deltametrina por hectárea (Aqua K-othrina®) aplicados mediante ULV frente a *Ae. albopictus*, alcanzando el 100% de mortalidad a los 25 metros en espacios abiertos y en condiciones climatológicas favorables. Se ha comprobado también que los factores ambientales, principalmente el viento, afectan drásticamente a esta eficacia a causa de la deriva del producto.
2. El efecto residual de las aplicaciones ULV realizadas frente a *Ae. albopictus* no ha proporcionado una mortalidad relevante (67,9 – 6,7% a los 25 metros 5 horas después del tratamiento). Dado que en el campo la mayoría de los *Ae. albopictus* adultos no se encuentran volando sino refugiados entre la vegetación, no entrarían en contacto directo con el insecticida, quedando afectados por esta mortalidad secundaria.
3. La impregnación de la vegetación (0.01 g de Deltametrina/m²), tratando a ser posible los *Hot Spots* (zonas con una elevada densidad de adultos), confiere una persistencia residual prolongada (70% de mortalidad a los 19 días) además del efecto de choque. Este es un método más adaptado a la biología de *Ae. albopictus* debido a su preferencia de descansar en la vegetación, la cual evitará también la degradación de las materias activas insecticidas por factores ambientales como la radiación UV
4. Según los resultados de nuestros trabajos, las aplicaciones volumétricas (ULV) pueden ser indicadas para tratamientos de choque frente a *Ae. albopictus* en grandes áreas urbanas en las cuales se tenga una cierta seguridad de la neutralización de la totalidad de los focos de cría, puesto que el tratamiento no conferirá un efecto residual. La deriva del producto y el riesgo que conllevan limita los lugares donde este tipo de tratamientos pueden ser realizados. Por otro lado, los tratamientos de impregnación de vegetación con insecticidas son una solución más adaptada a un tejido urbano con fincas ajardinadas, ya que son aplicaciones muy locales, poco susceptibles de deriva y por lo tanto de menor riesgo operativo. Sin embargo, prolongadas exposiciones con la vegetación tratada pueden favorecer la selección de mosquitos menos susceptibles y por lo tanto la aparición de poblaciones resistentes. El tipo de aplicación ha de ser cuidadosamente seleccionado por técnicos cualificados en función del escenario a tratar, teniendo en cuenta aspectos como el objetivo del tratamiento, la eficacia esperada, o la viabilidad técnica, además de criterios legales, sociales, toxicológicos o ecotoxicológicos y de generación de resistencias entre otros.

5. Las resistencias transmitidas genéticamente representan una grave amenaza para la eficacia de los tratamientos adulticidas en el futuro. Con una población de *Ae. albopictus* criada en laboratorio y considerada susceptible, se han fijado las concentraciones discriminantes de los adulticidas más empleados en España y Europa para el control de mosquitos: Deltametrina 0.05%, Permetrina 1% y Cipermetrina 0.1%. La ausencia de consenso sobre los valores de las concentraciones discriminantes así como sobre su criterio de cálculo conlleva a dificultades de comparación entre estudios.
6. Se han encontrado por primera vez en España resistencias y posibles resistencias frente a estos tres Piretroides en varias poblaciones de *Ae. albopictus*. Concretamente la población de Peñíscola ha resultado ser resistente a Cipermetrina y posible resistente a Deltametrina y Permetrina, mientras que las poblaciones de Barcelona y Castellón han presentado una posible resistencia a Cipermetrina. En vista de los resultados parece procedente no recomendar el uso de Cipermetrina frente a *Ae. albopictus*.
7. En vista de nuestros resultados se recomienda una rotación sistemática de materias activas insecticidas, aun no sospechando la presencia de poblaciones resistentes, ya que el uso exclusivo de una única materia activa podría fomentarlas. En el mercado europeo de biocidas no existe una gran variabilidad de familias de insecticidas, limitándose básicamente a Piretroides, pudiendo rotar entre los de tipo I, tipo II y tipo non-ester. Un uso abusivo e indiscriminado de insecticidas frente a *Ae. albopictus*, sin un control de calidad de los tratamientos, conllevará a la aparición de resistencias, como las descritas en *Ae. aegypti* en Sudamérica principalmente.

ANEXO: Arbovirus transmitidos por *Ae. albopictus* en Europa y los métodos de control aplicados.

El uso de tratamientos adulticidas ha sido utilizado en Europa para hacer frente a los brotes epidémicos detectados. Algunos de estos brotes (el total está reflejado en la Tabla 10) y los métodos de control empleados han sido:

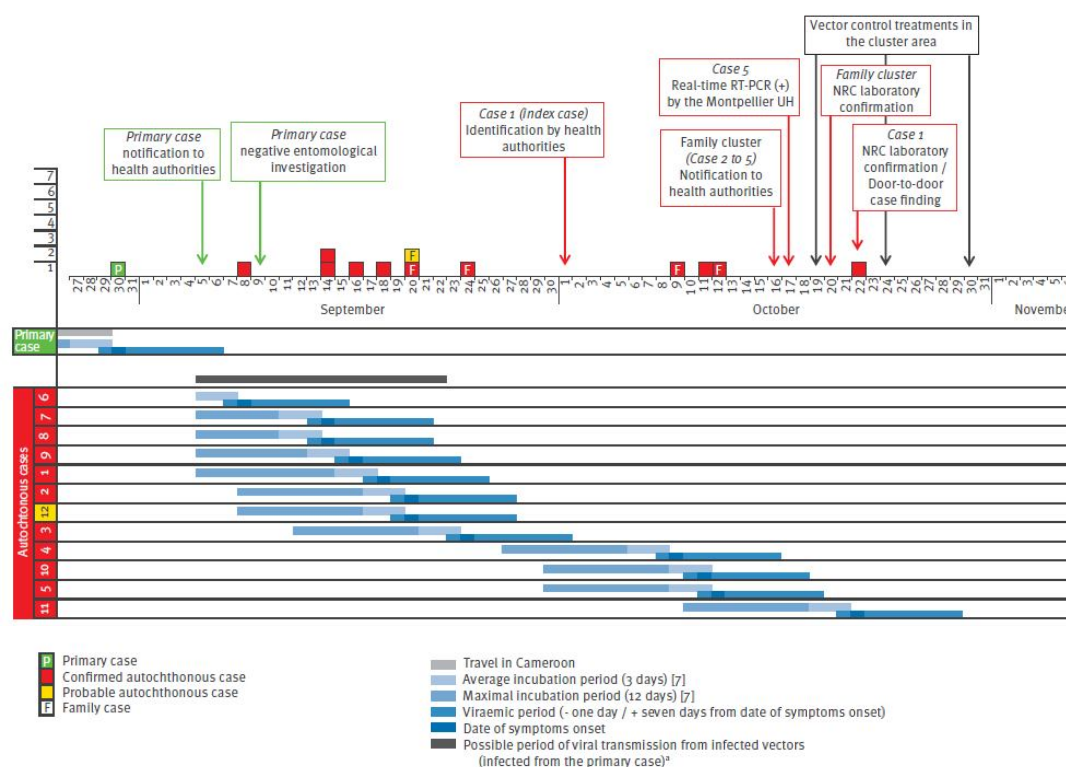
Italia 2007 – 248 casos de chikungunya: Entre Julio y Agosto de 2007, las autoridades sanitarias de Ravena (noreste de Italia) detectaron un número inusualmente alto de pacientes con fiebre alta en Castiglione di Cervia y Castiglione di Ravenna dos pequeños pueblos separados por un río. Se realizaron investigaciones epidemiológicas para diagnosticar retrospectivamente todos los pacientes con estas dolencias. A finales de Agosto se buscó el agente y la fuente de la infección, para entender mejor la dinámica de la epidemia de fiebre en la región. Se sospechaba de chikungunya ya que el primer paciente que presentaba estas fiebres altas era un hombre que procedía de un país afectado por este virus. Además, la presencia de *Ae. albopictus* en la zona era conocida. Finalmente se identificó chikungunya circulando en la población, y se identificó el caso 0 en un familiar del caso 1 que había visitado a éste el día 21 de Julio desde Kerala (India). Se implementaron medidas de control frente a *Ae. albopictus* en todas las zonas donde se identificaron casos de chikungunya. Estas medidas incluyeron el uso de insecticidas de acción rápida (Piretroides) durante 3 días consecutivos, aplicados con un atomizador montado sobre una camioneta para tratar zonas públicas y un atomizador de espalda para tratar las zonas privadas. También se llevaron a cabo tratamientos larvicidas con IGRs y *Bacillus thuringiensis* var *israeliensis*, así como intervenciones puerta a puerta para eliminar focos de cría (Rezza et al., 2007). La combinación de estas medidas de control es considerada como el mejor sistema para frenar el brote epidémico (Poletti et al., 2011). Este brote fue el primer ejemplo de la capacidad de este mosquito para transmitir enfermedades en Europa (Sambri et al., 2008) y gracias a él se pusieron en marcha programas para la monitorización de *Ae. albopictus*, y manuales para la inspección entomológica, epidemiológica y para su control en países donde este mosquito estaba presente, como Francia (La Ruche et al., 2010) o España (MSSSI 2016).

Croacia 2010 – 1 caso de dengue. No se tiene constancia de que se realizase ninguna medida de seguimiento ni control por parte de las autoridades croatas (Schmidt-Chanasit et al., 2010).

Francia 2010 – 2 casos de dengue. Se realizaron medidas de control vectorial mediante tratamientos adulticidas (sin especificar tipos de tratamientos o materias activas) y eliminación de focos de cría a 200 metros de los focos iniciales (La Ruche et al., 2010). El primer caso fue reportado en Agosto, posiblemente durante el periodo vacacional, lo que retrasó la aplicación de las medidas de control.

Francia 2010 – 2 casos de chikungunya. Para hacer frente a este brote se realizaron tratamientos adulticidas y se eliminaron focos de cría alrededor de las residencias de los pacientes y de las zonas que visitaron. No se detectaron más casos. (Grandadam et al., 2011)

Francia 2014 – 12 casos de chikungunya. Tras la identificación del Caso 1 se evaluó la presencia de *Ae. albopictus* en el vecindario y se observó una elevada densidad (30 adultos/trampa BG-Sentinel/día). Se realizaron tratamientos ULV con Deltametrina 1g/h (Aqua K-othrine®) los días 19, 24 y 30 de Octubre en un radio de 250 metros desde la residencia de cada caso, teniendo en consideración los espacios susceptibles (guarderías, escuelas, personas con hipersensibilidad, etc...). Tras el primer tratamiento se verificó la rápida reducción de la población de *Ae. albopictus*. También se realizaron inspecciones puerta a puerta para reducir focos de cría (Delisle et al., 2015). Como se ve en la Figura 6, los tratamientos de control del vector se realizaron ya en la fase final del brote, cuando únicamente había 4 personas en periodo virémico.



NRC: National Reference Center; RT-PCR: reverse transcriptase-PCR; UH: University Hospital.

Cases numbered by order of identification.

Source : French Institute for Public Health Surveillance (Institut de veille sanitaire), 2014.

^a Possible period of viral transmission from infected vector (infected from the primary case):- mosquitoes biting the primary case between the first day and the last day of his viraemic period, extrinsic incubation period: seven days [8], mosquito lifespan: 10 days [9].

Figura 6: Cronograma del brote epidémico de chikungunya en Francia en 2014.

Francia 2017 – 17 casos de chikungunya. Se puso en marcha el plan nacional de respuesta a chikungunya/dengue, con el nivel de riesgo 3. Entre otras acciones, se llevaron a cabo medidas de control alrededor de la casa y lugar de trabajo de cada caso, sin especificar si se realizaron tratamientos adulticidas o las materias activas empleadas (ECDC 2017a).

Italia 2017 – 298 casos de chikungunya. Se registraron dos clusters, uno en la región de Lazio y otro en la ciudad de Guardavalle Marina (Región de Calabria, en el sur de Italia) (Figura 10). Los métodos de control vectorial llevados a cabo en la región de Lazio han incluido tratamientos aéreos con Piretroides y tratamientos residuales sobre vegetación con Etofenprox, además de tratamientos larvicidas con Vectomax en imbornales y jardines privados. Del 12 al 18 de Septiembre realizaron tratamientos adulticidas y larvicidas tanto en lugares públicos como privados. En Calabria se utilizaron tratamientos adulticidas con piretroides y diflubenzurón como larvicida. (ECDC 2017b).



Figura 7: Distribución de casos autóctonos de chikungunya en Italia, de Julio al 3 de Octubre de 2017 (ECDC 2017b).

(Holanda 2010 – Introducción de especies de mosquito invasoras). Aunque no se trate de un brote epidémico de arbovirosis, en julio de 2010, durante inspecciones de vigilancia rutinarias en empresas que importan neumáticos se encontraron tres especies de mosquitos invasores (*Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* y *Ae. atropalpus*) en cinco localizaciones de los Países Bajos. El control de mosquitos se inició la semana siguiente a la primera detección, utilizando adulticidas y larvicidas. Pese a que no se describen estas medidas de control, los tratamientos fueron eficaces ya que tras éstos se dejaron de detectar esas especies invasoras (Scholte et al., 2010).

Año	País, Región, Municipio	Virus	Nº de Casos	Período	Origen del caso primario	CHIKV genotipo DENV serotipo
2007	Italia Región Emilia Romana	CHIKV	Unos 330	Julio a Septiembre	India	ESCA E1-A226V CHIKV
2010	Croacia	DENV	3	Agosto a Octubre	Desconocido	DEN-1
2010	Francia, Departamento de los Alpes Marítimos, Niza	DENV	2	Finales de Agosto a Septiembre	Desconocido	DEN-1
2010	Francia, Departamento de Var, Frejús	CHIKV	2	Septiembre	India	ESCA E1-A226 CHIKV
2012	Portugal, Madeira, Funchal	DENV	Unos 2010	Septiembre a Enero	Desconocido	DEN-1
2013	Francia, Departamento de la desembocadura del Ródano, Aix-en-Provence	DENV	1	Octubre	Guadalupe	Probablemente DEN-2
2014	Francia, Departamento de Herault, Montpellier	CHIKV	11	Agosto	Camerún	ESCA E1-A226V CHIKV
2014	Francia, Departamento de Var, Toulon	DENV	1	Agosto	Desconocido	DEN-1
2014	Francia, Departamento de Var, Toulon	DENV	1	Septiembre	Desconocido	DEN-2
2014	Francia, Departamento de la desembocadura del Ródano, Aubagne	DENV	2	Agosto a Septiembre	Desconocido	DEN-1
2015	Francia, Departamento de Gard, Nimes	DENV	6	Septiembre a Octubre	Posiblemente Polinesia Francesa	DEN-1
2017	Francia, Departamento de Var	CHIKV	17	Julio a Octubre	Africa Central	ESCA E1-A226V CHIKV
2017	Italia, Región de Lazio, (Anzio, Latina y Roma)	CHIKV	239	Agosto a Octubre	Asia	ESCA E1-A226 CHIKV
2017	Italia, Región de Calabria, Guardavalle	CHIKV	6	Agosto a Octubre	En estudio	En estudio

Tabla 10: Total de transmisiones autóctonas de dengue o chikungunya en Europa de 2007 a 2017

APÉNDICE

Índices de impacto de las revistas y sus áreas temáticas

según la base de datos de Journal Citation Reports

Journal of the American Mosquito Control Association. 2014. (Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain).

Índice de impacto: 0.948

Área temática: Entomology

Rango: 50/92

Cuartil: Q3

Journal of the American Mosquito Control Association. 2013. (Laboratory tests of the residual effect of Deltamethrin on vegetation against *Aedes albopictus*).

Índice de impacto: 0.827

Área temática: Entomology

Rango: 49/90

Cuartil: Q3

Journal of the American Mosquito Control Association. 2017. (First data on resistance to pyrethroids in wild populations of *Aedes albopictus* from Spain).

Índice de impacto (2016): 0.860

Área temática (2016): Entomology

Rango (2016): 52/93

Cuartil (2016): Q3

Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.). 2017. (Resistencias a insecticidas de los principales vectores de dengue, chikungunya y zika (diptera; culicidae). Implicaciones para España).

No indexada

Justificación de la contribución del doctorando

En todos los artículos el doctorando Mikel Bengoa Paulis ha llevado el peso investigador, realizando el diseño experimental, participando activamente en los ensayos de campo, realizando la estadística (bajo supervisión del Dr. Nacho de Blas en el caso del Modelo General Lineal), y redactando los artículos así como la presente memoria de tesis.

En el artículo 4.3 de la presente memoria de tesis (First data on resistance to pyrethroids in wild populations of *Aedes albopictus* from Spain), el único artículo en el que han intervenido más autores además del doctorando y de sus directores de tesis, el papel del doctorando ha sido la coordinación y realización de los trabajos. La recogida de las poblaciones de campo de *Ae. albopictus* para este estudio de resistencia a insecticidas fue llevada a cabo por Sarah Delacour, Roger Eritja (población Barcelona) y David Borrás (Mallorca). Posteriormente Sarah Delacour realizó la cría en laboratorio de las larvas, obteniendo en una generación un número suficiente de huevos para poder realizar los ensayos de resistencia a insecticidas. Toni Sureda dirigió los ensayos enzimáticos, que fueron realizados por el doctorando. Además de los directores de tesis (Javier Lucientes y Roger Eritja), otros dos autores son doctores (Miguel Ángel Miranda y Antonio Sureda), pero no es el caso de otra autora (Sarah Delacour), la cual ha firmado la renuncia para el uso de esta publicación en su doctorado.

Las aplicaciones adulticidas de los ensayos necesarios para el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis (Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain) no fueron realizadas por el doctorando, ya que no disponía en ese momento del carnet de aplicador de biocidas y dado que el vehículo y la máquina ULV eran manejadas por personal experimentado del Servei de Control de Mosquits del Baix Llobregat.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Tablas:

Tabla 1: Materias activas adulticidas recomendadas por diferentes documentos técnicos a nivel Europeo (Modificado de ECDC 2017c).....	11
Tabla 2: Características de las gotas en función de su tamaño.....	18
Tabla 3: Distancia recorrida por gotas liberadas a 1,3 metros de altura (Bonds 2012).....	19
Tabla 4: Insecticidas recomendados por la OMS para tratamientos residuales en interior frente a vectores de malaria.	22
Tabla 5: Datos publicados sobre la susceptibilidad de <i>Ae. albopictus</i> frente a Piretroides.....	28
Tabla 6: Datos publicados sobre la susceptibilidad de <i>Ae. albopictus</i> frente a otros insecticidas.	30
Tabla 7: Concentraciones discriminantes para mosquitos <i>Aedes</i> pendientes de confirmar (OMS 2016).	31
Tabla 8: Cantidad de insecticida en los papeles impregnados.	40
Tabla 9: Materias Activas incluidas en los formulados incluidos en el Registro Oficial de Biocidas (ROB)	84
Tabla 10: Total de transmisiones autóctonas de dengue o chikungunya en Europa de 2007 a 2017	94

Gráficas:

Gráfica 1: Recta patrón de proteína	42
---	----

Figuras:

Figura 1: Actividad de <i>Ae. albopictus</i> a lo largo de 24 horas en zona tropical (modificado de Delatte et al., 2010).	14
Figura 2: Diámetro medio de diferentes gotas en comparación con un cabello humano (www.InsectCop.net)	18
Figura 3: Criterios de resistencias determinados por la OMS y los mecanismos a estudiar. (OMS 2016).	25
Figura 4: Localización de las resistencias a insecticidas de <i>Ae. aegypti</i> registradas en VectorBase.	35
Figura 5: Localización de las resistencias a insecticidas de <i>Ae. albopictus</i> registradas en VectorBase.	36
Figura 6: Cronograma del brote epidémico de chikungunya en Francia en 2014.	92
Figura 7: Distribución de casos autóctonos de chikungunya en Italia, de Julio al 3 de Octubre de 2017 (ECDC 2017b).	93

Fotos:

Foto 1: Maquinaria ULV montada sobre vehículo, empleada en el artículo 4.1 de la presente memoria de tesis realizando un tratamiento adulticida.....	17
Foto 2: Armazón en forma de T usado en el artículo 4.1. de la presente memoria de tesis donde se colgaban a 1,5 m las jaulas de los mosquitos y en la base una planta para medir la persistencia del tratamiento.	20
Foto 3: <i>Hedera hélix</i> tratada en el artículo 4.2 de la presente memoria de tesis, e introducida en una jaula donde se determinará la mortalidad causada a lo largo del tiempo.	23
Foto 4: Microplaca con ensayo de proteína total, donde se aprecia a simple vista las diferencias de coloración lo que indica diferentes cantidades de proteínas en cada mosquito.	32

BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Franch F, Zamora-Perea E y Luz S. 2017. Mosquito-disseminated insecticide for citywide vector control and its potential to block arbovirus epidemics: entomological observations and modeling results from Amazonian Brazil. *PLoS Med*, 14(1): e1002213.
- Abramides GC, Roiz D, Guitart R, Quintana S, Guerrero I, Giménez N. 2011. Effectiveness of a multiple intervention strategy for the control of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105:281–8.
- Abramides GC, Roiz D, Guitart R, Quintana S, Giménez N. 2013. Control of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in a firmly established area in Spain: risk factors and people's involvement. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107(11):706-14
- Abu Hasan H, Jaal Z, Ranson H, McCall P. 2016. Pyrethroid and organophosphate susceptibility status of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Penang, Malaysia. *Int J Entomol Res* 3(3): 91-95.
- AFPMB [Armed Forces Pest Management Board]. 2011. Technical guide no. 13. *Dispersal of ultra low volume (ulv) insecticides by cold aerosol and thermal fog ground application equipment*. Washington, DC. EEUU
- Alarcón-Elbal PM, Delacour S, Pinal R, Ruiz-Arrondo I, Muñoz A, Bengoa M, Eritja R Lucientes J. 2010. Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología* 69(2):140-148.
- Alarcón-Elbal PM, Ruiz-Arrondo I, Delacour-Estrella S, Pinal S, Muñoz A, Bengoa M, Eritja R, Diéguez-Fernández L, Lucientes J. 2011 Estudio distribucional y medidas de control del mosquito *Aedes albopictus* (diptera, culicidae) en España (2004-2011). Poster en: 12º *Curso internacional Dengue*, Agosto 8-19. Habana, Cuba
- Ali A, Nayar JK, Xue RD. 1995. Comparative toxicity of selected larvicides and insect growth regulators to a Florida laboratory population of *Ae. albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 11:72-76.
- Alimi TO, Qualls WA, Roque DD, Naranjo DP, Samson DM, Beier JC, Xue RD. 2013. Evaluation of a new formulation of permethrin applied by water-based thermal fogger against *Aedes albopictus* in residential communities in St. Augustine, Florida. *J Am Mosq Control Assoc* 29(1):49-53.
- Allan SA, Kline DL, Walker TW. 2009. Environmental factors affecting efficacy of Bifenthrin-treated vegetation for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 25(3), 338-346.

- Amoo AO, Xue RD, Qualls WA, Quinn BP, Bernier UR. 2008. Residual efficacy of field-applied permethrin, d-phenothrin, and resmethrin on plant foliage against adult mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 24(4), 543-549.
- Antwi FB, Reddy GVP. 2015. Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40:915-923
- Aranda C, Eritja R, Roiz D. 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol* 20:150-152.
- Arrendondo-Jimenez JI, Rivero NE. 2006. Space treatments of insecticide for control of dengue virus vector *Aedes aegypti* in southern Mexico. I. Baseline penetration trials in open field and houses. *J Am Mosq Control Assoc* 22(2):301–305.
- Arslan A, Rathor HR, Mukhtar MU, Mushtaq S, Bhatti A, Asif M, Arshad I, Ahmad JF. 2016. Spatial distribution and insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in dengue affected urban areas of Rawalpindi, Pakistan. *J Vector Borne Dis* 53(2):136-43.
- ASPC [Agència de Salut Pública de Catalunya]. 2015. *Protocol per a la vigilància i el control de les arbovirosis transmeses per mosquits a Catalunya*. Barcelona. España.
- Bache DH, Johnstone DR. 1992. *Microclimate and Spray Dispersion*. Chichester, England: Ellis Horwood Limited. 238 p
- Baldacchino F, Bussola F, Arnoldi D, Marcantonio M, Montarsi F, Capelli G, Rosà R, Rizzoli A. 2017. An integrated pest control strategy against the Asian tiger mosquito in northern Italy: a case study. *Pest Manag Sci* 73(1):87-93
- Barber JAS, Greer M, Coughlin J. 2006. The effect of pesticide residue on caged mosquito bioassays. *J Am Mosq Control Assoc* 22 (3): 469–477.
- Becker N, Petric D, Zgomba D, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2013. *Mosquitoes and their Control – Segunda Edición*. En Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Bellini R, Albieri A, Balestrino F, Carrieri M, Porretta D, Urbanelli S, Calvitti M, Moretti R, Maini S. 2010. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) males in Italian urban areas and significance for sterile insect technique application. *J Med Entomol* 47: 1082-1091.
- Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos P. 2007. Spread of the Tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne Zoo. Dis* 7(1): 76-85.
- Bharati M, Saha D. 2017. Insecticide susceptibility status and major detoxifying enzymes' activity in *Aedes albopictus* (Skuse), vector of dengue and chikungunya in Northern part of West Bengal, India. *Acta Trop* 170:112-119.

- Bilal H, Hassan SA, Khan IA. 2012. Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(4):298-300.
- Bogojević MS, Merdić E, Bogdanović T. 2011. The flight distances of floodwater mosquitoes (*Aedes vexans*, *Ochlerotatus sticticus* and *Ochlerotatus caspius*) in Osijek, Eastern Croatia. *Biologia* 66: 678.
- Bohart RM. 1957. *Insects of Micronesia Diptera: Culicidae*. In: Bernice P. Bishop Museum eds. *Insects of Micronesia*. Volume 12. Honolulu, Hawaii.
- Bonds J. 2012. Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Med Vet Entomol* 26(2):121-30.
- Bonds JAS, Greer M, Coughlin J, Patel V. 2010. Caged mosquito bioassay: studies on cage exposure pathways, effects of mesh on pesticide filtration, and mosquito containment. *J Am Mosq Control Assoc* 26(1):50–6.
- Boobar LR., Dobson SE, Perich MJ, Darby WM, Nelson JH. 1988. Effects of screen materials on droplet size frequency distribution of aerosols entering sentinel mosquito exposure tubes. *Med Vet Entomol* 2(4):379–84.
- Boubidi Saïd C, Roiz D, Rossignol M, Chandre F, Benoit R, Raselli M, Tizon C, Cadiou B, Tounsi R, Lagneau C, Fontenille D, Reiter P. 2016. Efficacy of ULV and thermal aerosols of Deltamethrin for control of *Aedes albopictus* in Nice, France. *Parasit Vectors* 9(1):597.
- Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87–94.
- Britch SC, Linthicum KJ, Wynn WW, Walker TW, Farooq M, Smith VL, Lothrop HD. 2009. Evaluation of barrier treatments on native vegetation in a southern California desert habitat. *J Am Mosq Control Assoc* 25(2): 184-193.
- Brogdon WG, McAllister JC. 1998. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases* 4(4):605-613.
- Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, Jeannin C, Auzet-Caillaud M, Grard G, Pigaglio L, Decoppet A, Weicherding J, Savail MC, Munoz-Riviero M, Chaud P, Cadiou B, Ramalli L, Fournier P, Noël H, De Lamballerie X, Paty MC, Leparç-Goffart I. 2017. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Euro Surveill* 22(39).
- Cancrini G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M. 2003. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet Parasitol* 118(3-4):195-202.

- Caputo B, Ienco A, Cianci D, Pombi M, Petrarca V, Baseggio A, Devine GJ, della Torre A. 2012. The “Auto-Dissemination” approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas. *PLoS Negl Trop Dis* 6(8): e1793.
- Caputo B, Ienco A, Manica M, Petrarca V, Rosà R, della Torre A. 2015. New adhesive traps to monitor urban mosquitoes with a case study to assess the efficacy of insecticide control strategies in temperate areas. *Parasit Vectors* 8(1): 134.
- Caputo B, Manica M, D'Alessandro A, Bottà G, Filipponi F, Protano C, Vitali M, Rosà R, della Torre A. 2016. Assessment of the effectiveness of a seasonal-long insecticide-based control strategy against *Aedes albopictus* nuisance in an urban area. *PLoS Negl Trop Dis* 10(3): e0004463.
- Carrieri M, Bellini R, Maccaferri S, Gallo L, Maini S, Celli G. 2008. Tolerance thresholds for *Aedes albopictus* and *Aedes caspius* in Italian urban areas. *J Am Mosq Control Assoc* 24:377-386.
- CCAES [Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias]. 2015. *Evaluación Rápida del Riesgo de transmisión de fiebre por virus de Chikungunya en España*. Madrid.
- Chakraborti S, Mourya DT, Gokhale MD, Banerjee K. 1993. Insecticide susceptibility status and enzyme profile of *Aedes albopictus* populations from different localities of Maharashtra State. *Indian J Med Res* 97:37-43.
- Chan HH, Mustafa FFW, Zairi J. 2011. Assessing the susceptibility status of *Aedes albopictus* on Penang Island using two different assays. *Trop Biomed* 28(2):464–70.
- Chan HH, Zairi J. 2013. Permethrin Resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and associated fitness costs. *J Med Entomol* 50:362–370.
- Champion SR, Vitek CJ. 2014. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Habitat Preferences in South Texas, USA. *Environmental Health Insights* 8(2):35-42.
- Chareonviriyaphap T, Prabaripai A, Bangs MJ. 2004. Excito-repellency of Deltamethrin on the malaria vectors, *Anopheles minimus*, *Anopheles dirus*, *Anopheles swadiwongporni*, and *Anopheles maculatus*, in Thailand. *J Am Mosq Control Assoc* 20: 45-54.
- Chatterjee M, Ballav S, Maji AK, Basu N, Sarkar BC, Saha P. 2018. Polymorphisms in voltage-gated sodium channel gene and susceptibility of *Aedes albopictus* to insecticides in three districts of northern West Bengal, India. *PLoS Negl Trop Dis* 12(1): e0006192.
- Chen CD, Nazni WA, Lee HL, Sofian-Azirun M. 2005. Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to temephos in four study sites in Kuala Lumpur City Center and Selangor State, Malaysia. *Trop Biomed* 22(2):207-16.
- Chen H, Li K, Wang X, Yang X, Lin Y, Cai F, Zhong W, Lin C, Lin Z, Ma Y. 2016. First identification of *kdr* allele F1534S in VGSC gene and its association with resistance to pyrethroid

- insecticides in *Aedes albopictus* populations from Haikou City, Hainan Island, China. *Infect Dis Poverty* 2(5):31.
- Chen CD, Low VL, Lau KW, Lee HL, Nazni WA, Heo CC, Azidah AA, Sofian-Azirun M. 2013. First report on adulticide susceptibility status of *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Culex vishnui* from a pig farm in Tanjung Sepat, Selangor, Malaysia. *J Am Mosq Control Assoc* 29(3):243-50.
- Chilcott CN, Knowles BH, Ellar DJ, Drobniewski FA. 1990. *Mechanism of Action of Bacillus thuringiensis israelensis Parasporal Body*. En *Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies*, eds de Barjac, H. & Sutherland, D.J. pp. 45-65. New Brunswick: Rutgers University Press.
- Chuaycharoensuk T, Juntarajumnong W, Boonyuan W, Bangs MJ, Akwatanakul P, Thammaphalo S, Jirakanjanakit N, Tanasinchayakul S, Chareonviriyaphap. 2011. Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Vec Ecol* 36(1):204-12.
- Cianci D, Hartemink N, Zeimes CB, Vanwambeke SO, Ienco A, Caputo B. 2015. High Resolution Spatial Analysis of Habitat Preference of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Environment. *J Med Entomol* 52(3):329-35.
- Cilek JE, Hallmon CF. 2006. Residual effectiveness of pyrethroid-treated foliage against adult *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* in screened field cages. *J Am Mosq Control Assoc* 22(4), 725-731.
- Cilek JE, Hallmon CF. 2008. Residual effectiveness of three pyrethroids on vegetation against adult *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* in screened field cages. *J Am Mosq Control Assoc* 24(2), 263-269.
- Ciota AT, Drummond CL, Ruby MA, Drobnack J, Ebel GD, Kramer LD. 2012. Dispersal of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a wastewater treatment facility. *J Med Entomol* 49(1):35-42.
- Clark AG, Shamaan NA. 1984. Evidence that DDT dehydrochlorinase from the housefly is a glutathione S-transferase. *Pestic Biochem Physiol* 22, 249–261.
- CNEV [Centre National d'Expertise sur les Vecteurs]. 2016. *Guide à l'attention des collectivités souhaitant mettre en oeuvre une lutte contre les moustiques urbains vecteurs de Dengue, de Chikungunya et de Zika*. Montpellier. Francia.
- Collantes F, Delacour S, Alarcón-Elbal P, Ruiz-Arrondo I, Delgado J, Torrell-Sorio A, Bengoa M, Eritja R, Miranda MA, Molina R, Lucientes J. 2015. Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004–2014: known distribution and public health concerns. *Parasit Vectors* 8, 655.

- Collantes F, Delacour S, Delgado JA, Bengoa M, Torrell-Sorio A, Guinea H, Ruiz S, Lucientes J; Mosquito Alert. 2016. Updating the known distribution of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in Spain 2015. *Acta Tropica* 164: 64–68.
- Corbel V, Fonseca DM, Weetman D, Pinto J, Achee NL, Chandre F, Coulibaly MB, Dusfour I, Grieco J, Juntarajumnong W, Lenhart A, Martins AJ, Moyes C, Ng LC, Raghavendra K, Vatandoost H, Vontas J, Muller P, Kasai S, Fouque F, Velayudhan R, Durot C, David JP. 2017. International workshop on insecticide resistance in vectors of arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil. *Parasit Vectors* 10: 278.
- Cui F, Raymond M, Qiao CL. 2006. Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest Manag Sci* 62(11):1013-22.
- Dharshini S, Vinobaba M, Jude PJ, Karunaratne SH, Surendran SN. 2011. Prevalence and insecticide susceptibility of dengue vectors in the district of Batticaloa in eastern Sri Lanka. *Trop Med Health* 39: 47–52.
- Das M, Dutta P. 2014. Status of insecticide resistance and detoxifying enzyme activity of *Aedes albopictus* population in Sonitpur district of Assam, India. *Int J Mosq Res* 1(4):35-41.
- Delacour S, Barandika JF, García-Pérez A, Collantes F, Ruiz-Arrondo I, Alarcón-Elbal PM, Bengoa M, Delgado JA, Juste RA, Molina R, Lucientes J. 2015. Detección temprana de mosquito tigre, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), en el País Vasco (España). *Anales de Biología* 37: 25-30.
- Delacour S, Collantes F, Delgado JA, Bengoa M, Estrada R, Ventura M, Carter J, Bartumeus F, Lucientes J. 2017. Distribution and genetic studies of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in Spain. *The 7th International Congress of the Society for Vector Ecology (SOVE)*. Symposium 10. Palma de Mallorca, Spain.
- Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau G, Vourc'h G, Fontenille D. 2010. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(3):249-58.
- Delisle E, Rousseau C, Broche B, Leparc-Goffart I, L'Ambert G, Cochet A, Prat C, Foulongne V, Ferre JB, Catelinois O, Flusin O, Tchernonog E, Moussion IE, Wiegandt A, Septfonds A, Mendy A, Moyano MB, Laporte L, Maurel J, Jourdain F, Reynes J, Paty MC, Golliot F. 2015. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill* 20(17): pii=21108.
- DGS [Direction Générale de la Santé] (Ministère des affaires sociales et de la santé France). 2012. *Circulaire interministerielle no DGS/R11/DGALN/DGAL/2012/360 du 1er Octobre 2012 relative aux mesures visant à limiter la circulation du virus West Nile en France métropolitaine*. Paris. Francia.
- DGS [Direction Générale de la Santé] (Ministère des affaires sociales et de la santé France). 2013. *Guide relatif aux modalités de mise en oeuvre du plan anti-dissémination du Chikungunya et de la Dengue en métropole*. Paris. Francia.

- DGS [Direction Générale de la Santé] (Ministère des affaires sociales et de la santé France). 2015. *Instruction no DGS/RI1/2015/125 du 16 avril 2015 mettant à jour le guide relatif aux modalités de mise en oeuvre du plan anti-dissémination du Chikungunya et de la Dengue en métropole*. Paris. Francia.
- Dhiman S, Rabha B, Yadav K, Baruah I, Veer V. 2014. Insecticide susceptibility and dengue vector status of wild *Stegomyia albopicta* in a strategically important area of Assam, India. *Parasit Vectors* 7:295.
- Di Luca M, Severini F, Toma L, Boccolini D, Romi R, Remoli ME, Sabbatucci M, Rizzo C, Venturi G, Rezza G, Fortuna C. 2016. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill* 21(18): pii=30223.
- EC [European Parliament and of the Council]. 2009. *Directive 2009/128/EC establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides*. Bruselas. Bélgica.
- EC [European Parliament and of the Council]. 2013. *Directive 2013/06/EC amending Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council to include diflubenzuron as an active substance in Annex I*. Bruselas, Bélgica.
- EC [European Parliament and of the Council]. 1998. *Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market European Community*. Bruselas, Bélgica.
- Doyle MA. 2007. *Response of Aedes albopictus (Skuse) (diptera: culicidae) to residual bifenthrin on plant leaves*. Tesis. Universidad de Florida.
- Doyle MA, Kline DL, Allan SA, Kaufman PE. 2009. Efficacy of residual Bifenthrin applied to landscape vegetation against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 25(2):179-183.
- Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R. 2011. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(3):346-52.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2012. *Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe*. Estocolmo. Suecia.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2014. *Dengue outbreak in Madeira, Portugal, March 2013*. Estocolmo. Suecia.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2016 a. *Aedes albopictus*. <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-albopictus.aspx> [consultado el 28-11-2017].
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2016 b. *Annual Epidemiological Report – Chikungunya fever*. Estocolmo. Suecia.

- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2016 c. *Annual Epidemiological Report – Dengue fever*. Estocolmo. Suecia.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2016 d. *Rapid Risk Assessment. Zika virus disease epidemic. Eighth update, 30 August 2016*. Estocolmo. Suecia.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2017 a. *Cluster of autochthonous chikungunya cases in France – 23 August 2017*. Estocolmo. Suecia.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2017 b. *Clusters of autochthonous chikungunya cases in Italy, first update – 9 October 2017*. Estocolmo. Suecia.
- ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2017c. *Vector control with a focus on Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes: literature review and analysis of information*. Estocolmo. Suecia.
- Elliott M, Farnham AW, Janes NF, Needham PH, Pulman DA. 1973. A photo-stable pyrethroid. *Nature* 246, 169–170.
- EMCA [European Mosquito Control Association]. 2013. *Guidelines for the control of Mosquitoes of public health importance in Europe*.
- Enserink M. 2008. A mosquito goes global. *Science* 320(5878):864-6.
- Eritja R. 2013. Laboratory tests on the efficacy of VBC60035, a combined larvicidal formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* (strain AM65-52) and *Bacillus sphaericus* (strain 2362) against *Aedes albopictus* in simulated catch basins. *J Am Mosq Control Assoc* 29(3):280-3.
- Eritja R, Escosa R, Lucientes J, Marques E, Roiz D, Ruiz S. 2005. Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges in Spain. *Biological Invasions* 7(1):8.
- Eritja R, Herreros E. 2017. Spatial distribution of immature stages of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in flower pots in a Spanish cemetery and field evaluation of metallic copper as a control agent. *J Europ Mosq Control Assoc* 35: 13-17.
- Eritja R, Palmer JRB, Roiz D, Sanpera-Calbet I, Bartumeus F. 2017. Direct evidence of adult *Aedes albopictus* dispersal by car. *Scientific Reports* 7: 14399.
- Erlanger TE, Keiser J, Utzinger J. 2008. Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *Med Vet Entomol* 22:203-21.
- Estrada-Franco JG, Craig BC. 1995. *Biology, disease, and control of Aedes albopictus*. Technical Paper No. 42. Pan American Health Organization. Washington, D.C. EEUU.

- Esu E, Lenhart A, Smith L, Horstick O. 2010. Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Trop. Med. Int. Health* 15: 619-631.
- Faraji A, Unlu I, Crepeau T, Healy S, Crans S, Lizarraga G, Fonseca D, Gaugler R. 2016. Droplet Characterization and Penetration of an Ultra-Low Volume Mosquito Adulticide Spray Targeting the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, within Urban and Suburban Environments of Northeastern USA. *Plos One* 11(4): e0152069.
- Faraji A, Egizi A, Fonseca DM, Unlu I, Crepeau T, Healy SP, Gaugler R. 2014. Comparative host feeding patterns of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in urban and suburban Northeastern USA and implications for disease transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 8(8):e3037.
- Farajollahi A, Williams GM. 2013. An open-field efficacy trial using AquaDuet™ via an ultra-low volume cold aerosol sprayer against caged *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 29: 304–308.
- Farajollahi A, Healy SP, Unlu I, Gaugler R, Fonseca DM. 2012. Effectiveness of Ultra-Low Volume Nighttime Applications of an Adulticide against Diurnal *Aedes albopictus*, a Critical Vector of Dengue and Chikungunya Viruses. *Plos One* 7(11): e49181.
- Fernández-Salas I, Danis-Lozano R, Casas-Martínez M, Ulloa A, Bond JG, Marina CF, Lopez-Ordóñez T, Elizondo-Quiroga A, Torres-Monzón JA, Díaz-González EE. 2015. Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. *Antiviral Res* 124: 30-42.
- Fritz BK, Hoffmann WC, Farooq M, Walker T, Bonds J. 2010. Filtration effects due to bioassay cage design and screen type. *J Am Mosq Control Assoc* 26(4): 411–421.
- Glancey BM, Lofgren CS, Salmela J, Davis AN. 1965. Low volume aerial spraying of malathion for control of adult salt-marsh mosquitoes. *Mosq News* 25: 135–137.
- González R, Montalvo T, Camprubí E, Fernández L, Millet JP, Peracho V, Gorrindo P, Avellanés I, Romero A, Caylà JA. 2017. Casos confirmados de Dengue, Chikungunya y Zika en Barcelona capital durante el período de 2014 al 2016. *Rev Esp Salud Pública* 91; 1-12.
- Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souarès Y, Failloux AB, Tolou HG, Budelot M, Cosserat D, Leparç-Goffart I, Desprès P. 2011. Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* 17(5): 910-3.
- Gratz NG. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 18: 215–227.
- Guzzetta G, Trentini F, Poletti P, Baldacchino FA, Montarsi F, Capelli G, Rizzoli A, Rosà R, Merler S, Melegaro A. 2017. Effectiveness and economic assessment of routine larviciding for prevention of chikungunya and dengue in temperate urban settings in Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 11(9): e0005918.

- Hamdan H, Sofian-Azirun M, Nahmad NW, Lim LH. 2005. Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae against malathion, permethrin and temephos. *Trop Biomed* 22(1): 45-52.
- Hamer GL, Anderson TK, Donovan DJ, Brawn JD, Krebs BL, Gardner AM, Ruiz MO, Brown WM, Kitron UD, Newman CM, Goldberg TL, Walker ED. 2014. Dispersal of adult *Culex* mosquitoes in an urban West Nile virus hotspot: a mark-capture study incorporating stable isotope enrichment of natural larval habitats. *PLoS Negl Trop Dis* 8(3): e2768
- Harburguer L, Licastro S, Masuh H, Zerba E. 2016. Biological and chemical characterization of a new larvicide ovitrap made of plastic with Pyriproxyfen incorporated for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control. *J Med Entomol* 53(3): 647-652.
- Hawley WA. 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 4: 2-39.
- Healy K, Hamilton G, Crepeau T, Healy S, Unlu I, Farajollahi A, Fonseca DM. 2014. Integrating the public in mosquito management: active education by community peers can lead to significant reduction in peridomestic container mosquito habitats. *PLoS One* 9(9): e108504.
- Hemingway J, Karunaratne SH. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 653-665.
- Hoffmann W, Hewitt A. 2005. Comparison of three imaging systems for water-sensitive papers. *Applied engineering in agriculture* 21(6):961–964.
- Hoffmann WC, Fritz BK, Farooq M, Cooperband MF. 2008. Effects of wind speed on aerosol spray penetration in adult mosquito bioassay cages. *J Am Mosq Control Assoc* 24(3): 419-26.
- Hoffmann WC, Farooq M, Walker TW, Fritz B, Szumlas D, Quinn B, Bernier U. 2009. Canopy penetration and deposition of barrier spray from electrostatic and conventional sprayers. *J Am Mosq Control Assoc* 25(3), 323-331.
- Hudson JE. 1986. The emergency ultra-low-volume spray campaign against *Aedes aegypti* adults in Paramaribo, Suriname, 1982. *Bull Pan Health Org* 20: 292–301.
- Huijben S, Aranda C, Eritja R, Paaijmans K. 2017. Susceptibility to insecticides in *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* from Baix Llobregat (Barcelona, Spain) to inform vector control strategies. *The 7th International Congress of the Society for Vector Ecology (SOVE)* Poster 127. Palma de Mallorca, Spain.

- Ishak IH, Jaal Z, Ranson H, Wondji CS. 2015. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasit Vectors* 8: 181.
- Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Duchon S, Bellec C, Yoksun S. 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *J Econ Entomol* 100(2): 545-50.
- Kamgang B, Marcombe S, Chandre F, Nchoutpouen E, Nwane P, Etang J, Corbel V, Paupy C. 2011. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasit Vectors* 4: 79.
- Kamgang B, Yougang AP, Tchoupo M, Riveron JM, Wondji C. 2017. Temporal distribution and insecticide resistance profile of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Yaoundé, the capital city of Cameroon. *Parasit Vectors* 10:469.
- Karunaratne SHPP, Hemingway J, Jayawardena KGI, Dassanayaka V, Vaughan A, 1995. Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *J Biol Chem* 270: 31124–31128.
- Khan HA, Akram W, Shehzad K, Shaalan EA. 2011. First report of field evolved resistance to agrochemicals in dengue mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), from Pakistan. *Parasit Vectors* 22(4): 146.
- Khoo BK, Sutherland DJ, Sprenger D, Dickerson D, Nguyen H. 1988. Susceptibility status of *Aedes albopictus* to three topically applied adulticides. *J Am Mosq Control Assoc* 4: 310-313.
- Knapp FW, Roberts W. 1965. Low volume aerial application of technical malathion for adult mosquito control. *Mosq News* 25: 46-47.
- Kongmee M, Prabaripai A, Akranakul P, Bangs M, Chareonviriyaphap T. 2004 Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to Deltamethrin and possible implications for disease control. *J Med Entomol* 41 (6): 1055-1063.
- Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E. 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 313–319.
- Kushwah RBS, Dykes CL, Kapoor N, Adak T, Singh OP. 2015. Pyrethroid-resistance and presence of two Knockdown resistance (kdr) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1): e3332.
- La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, Lenglet A, Jourdain F, Leparç-Goffart I, Charlet F, Ollier L, Mantey K, Mollet T, Fournier JP, Torrents R, Leitmeyer K, Hilaiet P, Zeller H, Van Bortel W, Dejour-Salamanca D, Grandadam M,

- Gastellu-Etchegorry M. 2010. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill* 15: 19676.
- Lacroix R, Delatte H, Hue T, Reiter P. 2009. Dispersal and survival of male and female *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island. *J Med Entomol* 46: 1117-1124.
- Lee SJ, Kim S, Yu JS, Kim JC, Nai YS, Kim JS. 2015. Biological control of Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) using *Metarhizium anisopliae* JEF-003 millet grain. *J Asia Pacific Entomol* 18: 217.
- Lee RM, Choong CT, Goh BP, Ng LC, Lam-Phua SG. 2014. Bioassay and biochemical studies of the status of pirimiphos-methyl and cypermethrin resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore. *Trop Biomed* 31(4):670-9.
- Li CX, Wang ZM, Dong YD, Yan T, Zhang YM, Guo XX, Wu MY, Zhao TY, Xue RD. 2010. Evaluation of lambdacyhalothrin barrier spray on vegetation for control of *Aedes albopictus* in China. *J Am Mosq Control Assoc* 26: 346–348.
- Li Y, Xu J, Zhong D, Zhang H, Yang W, Zhou G, Su X, Wu Y, Wu K, Cai S, Yan G, Chen XG. 2018. Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China. *Parasit Vectors* 11(1):4.
- Liew C, Curtis CF. 2004. Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, in Singapore. *Med Vet Entomol* 18(4): 351-60.
- Liu H, Cupp EW, Guo AG, Liu N. 2004. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. *J Med Entomol* 41(5):946-52.
- Lounibos LP, Kramer LD. 2016. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for chikungunya virus. *J Infect Dis* 214(5): 453-S458.
- Macoris ML, Andrighetti MT, Wanderley DM, Ribolla PE. 2014. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 47(5): 573-578.
- Madden AH, Schroeder HO, Lindquist AW. 1947. Residual spray applications to salt-marsh and jungle vegetation for control of mosquitoes. *J Econ Entomol* 40(1), 119-123.
- Manica M, Cobre P, Rosà R, Caputo B. 2016a. Not in my backyard: effectiveness of outdoor residual spraying from hand-held sprayers against the mosquito *Aedes albopictus* in Rome, Italy. *Pest Manag Sci* 73(1):138-145
- Manica M, Filippini F, D'Alessandro A, Screti A, Neteler M, Rosà R, Solimini A, Della Torre A, Caputo. 2016b. Spatial and temporal Hot Spots of *Aedes albopictus* abundance inside and outside a south european metropolitan area. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6): e0004758.

- Manica M, Guzzetta G, Poletti P, Filipponi F, Solimini A, Caputo B, Della Torre A, Rosà R, Merler S. 2017. Transmission dynamics of the ongoing chikungunya outbreak in Central Italy: from coastal areas to the metropolitan city of Rome, summer 2017. *Euro Surveill* 22(44): pii=17-00685.
- Marchand E, Prat C, Jeannin C, Lafont E, Bergmann T, Flusin O, Rizzi J, Roux N, Busso V, Deniau J, Noel H, Vaillant V, Leparç-Goffart I, Six C, Paty MC. 2013. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill* 18(50): 20661.
- Marcombe S, Carron A, Darriet F, Etienne M, Agnew P, Tolosa M, Yp-Tcha MM, Lagneau C, Yébakima A, Corbel V. 2009. Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. *Am J Trop Med Hyg* 80(5): 745–51.
- Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM. 2014. Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PLoS One* 9(7): e101992.
- Marini F, Caputo B, Pombi M, Tarsitani G, della Torre A. 2010. Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark-release-recapture experiments. *Med Vet Entomol* 24(4): 361-8.
- Marini L, Baseggio A, Drago A, Martini S, Manella P, Romi R, Mazzon L. 2015. Efficacy of Two Common Methods of Application of Residual Insecticide for Controlling the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse), in Urban Areas. *PLoS One* 10(8): e0134831.
- Marten GG. 1990. Evaluation of cyclopoid copepods for *Aedes albopictus* control in tires. *J Am Mosq Control Assoc* 6(4): 681-8.
- MASSDF [Ministere des Affaires Sociales, de la Santé et des Droits des Femmes]. 2015. *Guide relatif aux modalités de mise en œuvre du plan anti-dissémination du chikungunya et de la dengue en métropole. Instruction n° DGS/RI1/2015/125 du 16 avril 2015*. París. Francia
- McAllister JC, Godsey MS, Scott ML. 2012. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Port-au-Prince, Haiti. *J Vec Ecol* 37: 325–332.
- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. 2012. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 435–447.
- Messenger K. 1963. Low volume aerial applications will be boon to applicators. *Agric Chem* 18 (12): 63–6
- Mitchell CJ. 1995. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin. *J Vec Ecol* 20: 44-58.

- Mohsin M, Naz SI, Khan I, Jabeen A, Bilal H, Ahmad R, Alshamrani Y, Khater EIM, Tambo E. 2016. Susceptibility status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* against insecticides at eastern Punjab, Pakistan. *MMJ* 3(5): 41-46.
- Moore CG, Mitchell CJ. 1997. *Aedes albopictus* in the United States: Ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Dis* 3(3): 329-334.
- Mount GA, Lofgren CS, Pierce NW, Husman CN. 1968. Ultra-low volume non thermal aerosols of malathion and naled for adult mosquito control. *Mosq News* 28: 99–103.
- Mount G. 1970. Optimum droplet size for adult mosquito control with space sprays or aerosols of insecticides. *Mosq News* 30: 70–75.
- Mount G. 1998. A critical review of ultralow-volume aerosols of insecticide applied with vehicle-mounted generators for adult mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 14(3): 305-334.
- MR4 [Malaria Research and Reference Reagent Resource Center]. 2007. *Methods in Malaria Research, 6th Edition* (2013), edited by Kirsten Moll, Inger Ljungström, Hedvig Perlmann, Artur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR, Glasgow, UK; BEI Resources/MR4. Manassas, VA. EEUU.
- MS [Ministero della Salute de Italia]. 2016. *Piano nazionale di sorveglianza e risposta alle arbovirosi trasmesse da zanzare (Aedes sp.) con particolare riferimento a virus Chikungunya, Dengue e virus Zika-2016*. Roma. Italia.
- MSSSI. 2016. *Plan nacional de preparación y respuesta frente a enfermedades transmitidas por vectores. Parte I: Dengue, Chikungunya y Zika*. Madrid. España.
- Mulligan FS III, Schaefer CH. 1990. Efficacy of a juvenile hormone mimic, Pyriproxyfen (S-31183), for mosquito control in dairy wastewater lagoons. *J Am Mosq Control Assoc* 6(1): 89-92.
- Muñoz J, Eritja R, Alcaide M, Montalvo T, Soriguer RC, Figuerola J. 2011. Host-Feeding Patterns of Native *Culex pipiens* and Invasive *Aedes albopictus* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Urban Zones from Barcelona, Spain. *J Med Entomol* 48(4): 956-960.
- Muzari OM, Adamczyk R, Davis J, Ritchie S, Devine G. 2014. Residual effectiveness of λ -cyhalothrin harbourage sprays against foliage resting mosquitoes in North Queensland. *J Med Entomol* 51: 444–449.
- Nauen R. 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag Sci* 63: 628-633.
- Neng W1, Yan X, Fuming H, Dazong C. 1992. Susceptibility of *Aedes albopictus* from China to insecticides, and mechanism of DDT resistance. *J Am Mosq Control Assoc* 8(4):394-7.

- OMS. 1975. *Manual on Practical Entomology in Malaria. Part II. Methods and Techniques*. World Health Organization. Ginebra. Suiza.
- OMS. 1998. *Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual)*. WHO/CDS/CPC/MAL/98.6. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2001. *Malaria Vector Control - Insecticides for indoor residual spray*. WHO/CDS/WHOPES/2001.3. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2003. *Space spray application of insecticides for vector and public health pest control. A practitioner's guide* WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2004. *Decision-making for the judicious use of insecticides - Participant's guide*. WHO/CDS/WHOPES/2004.9a. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2006a. *Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance*. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2006b. *Guidelines for Testing Mosquito Adulticides for Indoor Residual Spraying and Treatment of Mosquito Nets*. WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.3. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2006c. *Report of the ninth WHOPES working group meeting. Review of: Dimilin gr and dt, Vectobac dt, Aqua K-othrine and Aqua reslin super*. WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2008. *El control integrado de vectores: una respuesta integral a las enfermedades de transmisión vectorial*. WHO/CD48/13. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2009. *Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications*. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.2. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2011a. *Guidelines for drinking-water quality - 4th ed*. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2011b. *Generic risk assessment model for indoor residual spraying of insecticides - rev.1*. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2010.5 rev.1. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2014. *Discriminating concentrations of insecticides for adult mosquitoes*. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12 y WHO Technical Report Series 818. Ginebra. Suiza.
- OMS. 2016. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Second Edition*. Ginebra. Suiza.
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11: 1177-1185.
- Perich MJ, Tidwell MA, Dobson SE, Sardelis MR, Zaglul A, Williams DC. 1993. Barrier spraying to control the malaria vector *Anopheles albimanus*: laboratory and field-evaluation in the Dominican Republic. *Med Vet Entomol* 7: 363–368.

- Pichler V, Bellini R, Veronesi R, Arnoldi D, Rizzoli A, Lia RP, Otranto D, Montarsi F, Carlin S, Ballardini M, Antognini E, Salvemini M, Brianti E, Gaglio G, Manica M, Cobre P, Serini P, Velo E, Vontas J, Kioulos I, Pinto J, Della Torre A, Caputo B. 2017. First evidence of resistance to pyrethroid insecticides in Italian *Aedes albopictus* populations after 26 years since invasion. *Pest Manag Sci*. Accepted Author Manuscript.
- Poletti P, Messeri G, Ajelli M, Vallorani R, Rizzo C, Merler S. 2011. Transmission Potential of Chikungunya Virus and Control Measures: The Case of Italy. *PLoS One* 6(5): e18860.
- Ponlawat A, Scott JG, Harrington LC. 2005. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *J Med Entomol* 42(5): 821-5.
- Rahim J, Ahmad AH, Maimusa AH. 2017a. Effects of temephos resistance on life history traits of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), a vector of arboviruses. *Revista Brasileira de Entomologia* 61(4), 312-317.
- Rahim J, Ahmad AH, Ahmad H, Ishak IH, Rus AC, Maimusa HA. 2017b. Adulticidal susceptibility evaluation of *Aedes albopictus* using new diagnostic doses in Penang island, Malaysia. *J Am Mosq Control Assoc* 33(3):200-208.
- Ranson H, Hemingway J. 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 226–241.
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black WC. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropKAnet Journal* 1(1).
- Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C. 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 112–113: 287–296.
- Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, *por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. BOE núm. 185, de 03/08/2013. Madrid. España.
- EC [European Parliament and of the Council]. 2012. Regulation 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Official Journal of the European Communities. Bruselas. Bélgica.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A; CHIKV study group. 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840–1846
- Rocha HD, Paiva MH, Silva NM, de Araújo AP, Camacho Ddos R, Moura AJ, Gómez LF, Ayres CF, Santos MA. 2015. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. *Acta Tropica* 152: 66-73.

- Richards SL, Ghosh SK, Zeichner BC, Apperson CS. 2008. Impact of source reduction on the spatial distribution of larvae and pupae of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in suburban neighborhoods of a Piedmont community in North Carolina. *J Med Entomol* 45(4): 617-28.
- RIVM [Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu]. 2012. Preventie en bestrijding van exotische muggen in Nederland. Bilthoven. Países Bajos.
- Romi R, Toma L, Severini F, Di Luca M. 2003. Susceptibility of Italian populations of *Aedes albopictus* to temephos and to other insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 19(4): 419-23.
- Romi R, Toma L, Severini F, Di Luca M, Boccolini D, Ciufolini MG, Nicoletti L, Majori G. 2009. *Linee guida per il controllo di Culicidi potenziali vettori di arbovirus in Italia*. Istituto Superiore di Sanità. Roma. Italia.
- Rozilawati H, Lee HL, Mohd Masri S, Mohd Noor I, Rosman S. 2005. Field bioefficacy of Deltamethrin residual spraying against dengue vectors. *Trop Biomed* 22(2): 143-8.
- RV [Regione del Veneto]. 2009. *Linee operative per la lotta all zanzara: manuale per gli operatori*. Venecia. Italia.
- Ryckebusch F, Matondo M, Misse D, Choumet V. 2016. *Infection of Aedes albopictus and Aedes aegypti with Zika virus: perspectives for an emergence in Europe*. International Zika Summit 2016; 25-26 April. Institute Pasteur. Paris. Francia.
- Salazar P, Jané M, Maresm M, Plasencia A. 2018. Evaluación del riesgo de transmisión autóctona del virus Zika y otras enfermedades virales emergentes transmitidas por mosquitos en Cataluña. *Gac Sanit* 32:101-5.
- Sambri V, Cavrini F, Rossini G, Pierro A, Landini MP. 2008. The 2007 epidemic outbreak of Chikungunya virus infection in the Romagna region of Italy: a new perspective for the possible diffusion of tropical diseases in temperate areas?. *New Microbiol* 31(3): 303-4.
- Samson DM, Qualls WA, Roque D, Naranjo DP, Alimi T, Arheart KL, Müller GC, Beier JC, Xue RD. 2013. Resting and Energy Reserves of *Aedes albopictus* Collected in Common Landscaping Vegetation in St. Augustine, Florida. *J Am Mosq Control Assoc* 29(3): 231-236.
- Santos TN. 2017. Distribuição espacial e perfil de resistência do *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro - Brasil. 2017. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil.
- Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schoneberg I, Gunther S, Stark K, Frank C. 2010. Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill* 15(40):3-4.
- Scholte E-J, Knols BGJ, Samson RA, Takken W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *J Insect Science* 4: 19.

- Scholte E-J, Takken W, Knols BGJ. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica* 102(3): 151-8.
- Scholte E, Den Hartog W, Dik M, Schoelitsz B, Brooks M, Schaffner F, Foussadier R, Braks M, Beeuwkes J. 2010. Introduction and control of three invasive mosquito species in the Netherlands, July–October 2010. *Euro Surveill* 15(45): pii=19710.
- Sharma SN, Saxena VK, Lal S. 2004. Study on susceptibility status in aquatic and adult stages of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* against insecticides at international airports of south India. *J Commun Dis* 36(3): 177-81.
- Sivan A, Shriram AN, Sunish IP, Vidhya PT. 2015. Studies on insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* (Linn) and *Aedes albopictus* (Skuse) vectors of dengue and chikungunya in Adaman and Nicobar Islands, India. *Parasitol Res* 114(12): 4693-702.
- Smith LB, Kasai S, Scott JG. 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic Biochem Physiol* 133: 1-12.
- Snetselaar J, Andriessen R, Suer RA, Osinga AJ, Knols BG, Farenhorst M. 2014. Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors* 7: 200.
- SSRER [Servizio Sanitario Regionale Emilia-Romagna]. 2016. *Piano sorveglianza arbovirosi*. Bologna. Italia.
- Somboon P, Prapanthadara LA, Suwonkerd W. 2003. Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus s.l.*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health* 34(1): 87-93.
- Sukkanon C, Yaicharoen R, Ngrenngarmmlert W. 2016. Comparative effectiveness of monomolecular surface film on *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles minimus* (Theobald) (Diptera: Culicidae). *Agriculture and Natural Resources* 50:6, 465-469.
- Suman DS, Healy SP, Farajollahi A, Crans SC, Gaugler R. 2012. Efficacy of Duet dual-action adulticide against caged *Aedes albopictus* with the use of an ultra-low volume cold aerosol sprayer. *J Am Mosq Control Assoc* 28(4): 338-40.
- Sun D, Indelicato N, Petersen J, Williges E, Unlu I, Farajollahi A. 2014. Susceptibility of field-collected mosquitoes in central New Jersey to organophosphates and a pyrethroid. *J Am Mosq Control Assoc* 30(2): 138-42.
- Suter T, Crespo MM, de Oliveira MF, de Oliveira TSA, de Melo-Santos MAV, de Oliveira CMF, Ayres CFJ, Barbosa RMR, Araújo AP, Regis LN, Flacio E, Engeler L, Müller P, Silva-Filha MHN. 2017. Insecticide susceptibility of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* from Brazil and the Swiss-Italian border region. *Parasit Vectors* 10:431.

- Sullivan MF, Gould DJ, Maneechai S. 1971. Observations on the host range and feeding preferences of *Aedes albopictus* (Skuse). *J Med Entomol* 8(6): 713-6.
- Tantely ML, Tortosa P, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A, Dehecq JS, Makoundou P, Labbé P, Pasteur N, Weill M. 2010. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 317-324.
- Thanispong K, Sathantriphop S, Malaithong N, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. 2015. Establishment of diagnostic doses of five pyrethroids for monitoring physiological resistance in *Aedes albopictus* in Thailand. *J Am Mosq Control Assoc* 31(4): 346-52.
- Thistle, H. 2000. The role of stability in fine pesticide droplet dispersion in the atmosphere: A review of physical concepts. *Trans Am Soc Agric Eng* 43(6), 1409-13.
- Thomas SM, Obermayr U, Fischer D, Kreyling J, Beierkuhnlein C. 2012. Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors* 5: 100.
- Trout R, Brown G, Potter M, Hubbard J. 2007. Efficacy of two pyrethroid insecticides applied as barrier treatments for managing mosquito (Diptera: Culicidae) populations in suburban residential properties. *J Med Entomol* 44: 470–477.
- Unlu I, Klingler K, Indelicato N, Faraji A, Strickman D. 2016. Suppression of *Aedes albopictus*, the Asian tiger mosquito, using a “hot spot” approach. *Pest Manag Sci* 72: 1427–32.
- Valerio L, Marini F, Bongiorno G, Facchinelli L, Pombi M, Caputo B, Maroli M, Della Torre A. 2010. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts within Rome province, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(3): 291-4.
- Vazquez-Prokopec GM, Medina-Barreiro A, Che-Mendoza A, Dzul-Manzanilla F, Correa-Morales F, Guillermo-May G, Bibiano-Marín W, Uc-Puc V, Geded-Moreno E, Vadillo-Sánchez J, Palacio-Vargas J, Ritchie SA, Lenhart A, Manrique-Saide P. 2017. Deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* results in treatment failure in Merida, Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 11(6): e0005656.
- Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, Grandadam M, Failloux AB. 2013. High Efficiency of Temperate *Aedes albopictus* to Transmit Chikungunya and Dengue Viruses in the Southeast of France. *PLoS One* 8(3): e59716.
- Venturi G, Di Luca M, Fortuna C, Remoli ME, Riccardo F, Severini F, Toma L, Del Manso M, Benedetti E, Caporali MG, Amendola A, Fiorentini C, De Liberato C, Giammattei R, Romi R, Pezzotti P, Rezza G, Rizzo C. 2017. Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Euro Surveill* 22(39): pii=17-00646.
- Veronesi R, Carrieri M, Maccagnani B, Maini S, Bellini R. 2015. *Macrocyclus albidus* (Copepoda: cyclopidae) for the Biocontrol of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 31(1): 32-43.

- Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pest Biochem Physiol* 104(2): 126–131.
- Wan-Norafikah O, Nazni WA, Lee HL, Chen CD, Wan-Norjuliana WM, Azahari AH, Mohd AH. 2008. Detection of permethrin resistance in *Aedes albopictus* Skuse, collected from Titiwangsa Zone, Kuala Lumpur, Malaysia. *Proc ASEAN Congr Trop. Med. Parasitol* 3: 69–77.
- Wan-Norafikah O, Nazni WA, Lee HL, Zainol-Arifin P, Sofian-Azirun M. 2013. Susceptibility of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) to permethrin in Kuala Lumpur, Malaysia. *Asian Biomed* 7: 51–62.
- Weaver SC, Reisen WK. 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85: 328–45.
- Wesson DM. 1990. Susceptibility to organophosphate insecticides in larval *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 6: 258–264.
- Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM. 2008. *Global pesticide resistance in arthropods*, CAB International, Cambridge, 208 pp.
- Williges E, Faraji A, Gaugler R. 2014. Vertical Oviposition preferences of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in temperate North America. *J Am Mosq Control Assoc* 30(3): 169–74.
- Wong PSJ, Li MZL, Chong CS, Ng LC, Tan CH. 2013. *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse): A potential vector of zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis* 7(8): e2348.
- Xue RD, Kline DL, Ali A, Barnard DR. 2006. Application of boric acid baits to plant foliage for adult mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 22(3): 497–500.
- Yadav KK, Bora A, Datta S, Chandel K, Gogoi HK, Prasad GB, Veer V. 2015. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasit Vectors* 8: 641.
- Zheng M-L, Zhang D-J, Damiens DD, Lees RS, Gilles JRL. 2015. Standard operating procedures for standardized mass rearing of the dengue and chikungunya vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) - II - Egg storage and hatching. *Parasit Vectors* 8: 348.