



CH-3003 Bern

BAFU; GUB

POST CH AG

CANCELLERIA COMUNALE
COLDRERIO

20 MAR. 2025

A:

Einschreiben

Dr. Eleonora Flacio
Settore Ecologia dei vettori, Istituto Microbiologia
(IM)
Università professionale della Svizzera italiana
(SUPSI)
Via Flora Ruchat-Roncati 15
6850 Mendrisio

Aktenzeichen: BAFU-217.23-64640/1

Geschäftsfall:

Ihr Zeichen:

Bern, 19. März 2025

Verfügung

vom 19. März 2025

betreffend das

Gesuch B25001 der Università professionale della Svizzera italiana vom 31. Januar 2025 um Bewilligung für einen Freisetzungsversuch mit sterilisierten Männchen der gebietsfremden Tigermücke (*Aedes albopictus*) an verschiedenen Standorten im Kanton Tessin.

A. Sachverhalt

Die Università professionale della Svizzera italiana (Gesuchstellerin) hat beim Bundesamt für Umwelt (BAFU) am 31. Januar 2025 ein Gesuch um Bewilligung für einen Freisetzungsversuch mit sterilisierten Männchen der gebietsfremden Tigermücke (*Aedes albopictus*) eingereicht und dabei ein vereinfachtes Bewilligungsverfahren beantragt. Das BAFU hat den Eingang des Gesuchs mit Schreiben vom 3. Februar 2025 bestätigt und die Gesuchsunterlagen auf ihre Vollständigkeit überprüft. Mit Schreiben vom 13. und 20. Februar 2025 hat es von der Gesuchstellerin fehlende Angaben zu den Gesuchsunterlagen nachgefordert. Diese Angaben hat die Gesuchstellerin am 14. und 20. Februar 2025 nachgereicht.

B. Erwägungen

Wer gebietsfremde wirbellose Kleintiere, die für den direkten Umgang in der Umwelt und nicht als Heimtiere bestimmt sind, im Versuch freisetzen will, benötigt eine Bewilligung des BAFU (Art. 17 Bst. c

Bundesamt für Umwelt BAFU
Bernadette Guenot
3003 Bern
Standort: Monbijoustrasse 40, 3011 Bern
Tel. +41 58 46 293 28 Fax +41 58 46 479 78
bernadette.guenot@bafu.admin.ch
<https://www.bafu.admin.ch>



in Verbindung mit [i.V.m.] Art. 3 Abs. 1 Bst. d und f sowie j und i Freisetzungsverordnung [FrSV; SR 814.911]). Tigermücken sind ursprünglich aus Südostasien stammende Gliederfüsser und damit gebietsfremde wirbellose Kleintiere im Sinne von Artikel 3 Absatz 1 Buchstabe d i.V.m. Buchstabe f FrSV. Ein direkter Umgang in der Umwelt liegt bei jeglichen beabsichtigten Tätigkeiten mit Organismen, ausgenommen mit solchen in der Form von Arznei-, Lebens- oder Futtermitteln, ausserhalb eines geschlossenen Systems vor (Art. 3 Abs. 1 Bst. j i.V.m. Bst. i FrSV). Die sterilen Tigermücken-Männchen sollen zur Bekämpfung der Tigermücke in der Umwelt freigelassen werden; sie stellen weder Arznei-, Lebens- oder Futtermittel dar noch sind sie als Heimtiere bestimmt. Ihre versuchsweise Freisetzung bedarf daher einer Bewilligung des BAFU.

Das BAFU prüft, ob das eingereichte Gesuch vollständig ist (Art. 36 Abs. FrSV). Dieses muss namentlich einen Beschrieb des Versuchs, ein technisches Dossier, die Ergebnisse früherer Versuche und eine Risikoermittlung und -bewertung nach Anhang 4 FrSV umfassen (Art. 21 Abs. 2 FrSV). Wurde bereits ein Freisetzungsversuch mit vergleichbaren möglichen Gefährdungen und Beeinträchtigungen in der Schweiz bewilligt, insbesondere mit denselben Organismen, kann die Durchführung eines vereinfachten Bewilligungsverfahrens beantragt werden (Art. 22 Abs. 1 Bst. a FrSV). Diesfalls kann das BAFU unter anderem auf ein technisches Dossier und die Ergebnisse früherer Versuche verzichten (Art. 22 Abs. 2 i.V.m. Art. 39 Abs. 2 Bst. a FrSV). Soll ein Freisetzungsversuch mit einem gebietsfremden Organismus zum selben Zweck innerhalb eines begrenzten Zeitraumes an verschiedenen Orten durchgeführt werden, genügt ein Gesuch (Art. 21 Abs. 5 Bst. a FrSV). Ist das Gesuch vollständig, publiziert das BAFU dessen Eingang im Bundesblatt (BBl) und sorgt dafür, dass die nicht vertraulichen Akten während 30 Tagen beim BAFU und in den Gemeinden, in denen der Versuch durchgeführt werden soll, zur Einsicht aufliegt (Art. 36 Abs. 2 FrSV). Gleichzeitig mit der Publikation stellt das BAFU die Gesuchsunterlagen den folgenden Fachstellen zur Beurteilung in ihrem Fachbereich und zur Stellungnahme innert 50 Tagen zu: dem Bundesamt für Gesundheit (BAG), dem Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV) und dem Bundesamt für Landwirtschaft, der Eidgenössischen Fachkommission für biologische Sicherheit (EFBS) und der Eidgenössischen Ethikkommission für die Biotechnologie im Ausserhumanbereich (EKAH) sowie der vom betroffenen Kanton bezeichneten Fachstelle (Ufficio della gestione dei rischi ambientali e del suolo, Sezione della protezione dell'aria, dell'acqua e del suolo). Sind die Voraussetzungen für ein vereinfachtes Verfahren erfüllt, kann es die Frist für die Stellungnahme kürzen (Art. 39 Abs. 2 Bst. b FrSV).

Für den geplanten Freisetzungsversuch sollen im Labor gezüchtete und sterilisierte Tigermücken-Männchen an verschiedenen Standorten im Tessin freigelassen werden, um Populationen lokaler Tigermücken zu vermindern. Bereits in dem vom BAFU bewilligten Freisetzungsversuch B21002 wurden sterile Tigermücken-Männchen, die mit denselben Methoden behandelt worden waren, zum selben Zweck freigesetzt. Die möglichen Gefährdungen und Beeinträchtigungen des beantragten Versuchs sind daher mit dem bewilligten Versuch B21002 vergleichbar; es kann ein vereinfachtes Bewilligungsverfahren durchgeführt werden.

Das BAFU ist nach Prüfung der ergänzten Unterlagen zum Schluss gekommen, dass das Gesuch den Anforderungen an ein vereinfachtes Gesuch genügt und vollständig ist. Somit kann der Eingang des Gesuchs im BBl angezeigt und die nicht vertraulichen Akten können während 30 Tagen zur Einsicht beim BAFU und in den Gemeinden aufgelegt werden, in welchen der Freisetzungsversuch stattfinden soll. Freisetzungen sind an Standorten in den Gemeinden Ascona, Balerna, Bellinzona, Castel San Pietro, Chiasso, Coldrerio, Locarno, Losone, Lugano, Melide, Mendrisio, Muzzano, Paradiso, Riva San Vitale und Tenero-Contra vorgesehen. Einer der geplanten Standorte in Muzzano liegt knapp 50 m zur Gemeinde Agno entfernt. Gemäss Untersuchungen im Rahmen des bewilligten Versuchs B21002 konnten ca. 80% der freigelassenen Tigermücken-Männchen 100 m weit fliegen. Es ist daher davon auszugehen, dass ein Teil der in Muzzano freizulassenden Insekten die Gemeinde Agno erreichen wird. Daher ist das Gesuch ebenfalls in der Gemeinde Agno öffentlich aufzulegen.

Gleichzeitig kann das vollständige Gesuch gestützt auf Artikel 37 Absatz 1 und 2 FrSV dem BAG, BLV, dem BLW, der EFBS und der EKAH sowie der kantonalen Fachstelle zur Stellungnahme unterbreitet werden. Die übliche Frist von 50 Tagen wird gestützt auf Artikel 39 Absatz 2 Buchstabe a FrSV auf 30 Tage ab Beginn der öffentlichen Auflage gekürzt.

Der Gesuchseingang wird am 26. März 2025 im Bundesblatt publiziert, so dass die Fristen für allfällige Einsprachen und Stellungnahmen nach Artikel 36 Absätze 3 und 4 sowie für die Stellungnahmen durch die Fachstellen am 12. Mai 2025 zu laufen beginnen (Art. 20 Verwaltungsverfahrensgesetz vom 20. Dezember 1968 [SR 172.021]). Das BAG, das BLV, das BLW, die EFBS, die EKAH sowie die kantonale Fachstelle haben das BAFU unverzüglich zu informieren, falls aus ihrer Sicht die eingereichten Unterlagen zur Beurteilung des Gesuchs nicht ausreichen, damit das BAFU gestützt auf Artikel 37 Absatz 4 FrSV zusätzliche Informationen von der Gesuchstellerin verlangen kann.

C. Dispositiv

Aufgrund dieser Erwägungen verfügt das BAFU:

1. Das ergänzte Gesuch vom 31. Januar 2025 ist vollständig.
2. Der Eingang des Gesuchs wird am 26. März 2025 im BBI publiziert und die nicht vertraulichen Akten werden während 30 Tagen (bis und mit 12. Mai 2025) zur Einsicht aufgelegt:
 - beim Bundesamt für Umwelt, Abteilung Boden und Biotechnologie, Worblentalstrasse 68, 3063 Ittigen;
 - bei den Standortgemeinden:
 - Comune di Agno, Ufficio tecnico, Piazza Colonnello Virari 1, 6982 Agno
 - Municipio del Borgo di Ascona, Piazza San Pietro 1, Casella postale, 6612 Ascona
 - Comune di Balerna, Municipio, Via San Gottardo 90, casella postale, 6828 Balerna
 - Città di Bellinzona, Dicastero anziani e ambiente, Settore servizi urbani e ambiente, El Cunvent 3, 6513 Monte Carasso
 - Comune di Castel San Pietro, Cancelleria comunale, C.P. 11, Via alla Chiesa 10, 6874 Castel San Pietro
 - Comune di Chiasso, Ufficio Ambiente, Via degli Albrici 3a, 6830 Chiasso
 - Comune di Coldrerio, Municipio, Via P.F.Mola 17b - C.P. 18, 6877 Coldrerio
 - Città di Locarno, Piazza Grande 18, 6600 Locarno
 - Comune di Losone, Municipio, CP 863, 6616 Losone
 - Città di Lugano, Spazi urbani, Via Sonvica 4A, 6900 Lugano
 - Comune di Melide, via S. Franscini 6, 6815 Melide
 - Città di Mendrisio, Municipio, Via Municipio 13, 6850 Mendrisio
 - Municipio di Muzzano, Cancelleria comunale, Piazza delle Scuole 3, 6933 Muzzano
 - Comune di Paradiso, Municipio, Via delle Scuole 23, 6900 Paradiso
 - Comune di Riva San Vitale, Ufficio tecnico, c/o Palazzo comunale, Piazza Grande 6, 6826 Riva San Vitale
 - Comune di Tenero-Contra, Via Stazione 7, 6598 Tenero
3. Das Gesuch wird am 26. März 2025 zur Stellungnahme bis zum 12. Mai 2025 zugestellt:
 - dem BAG,
 - dem BLW,
 - dem BLV,
 - der EFBS,
 - der EKAH,
 - dem Kanton Tessin, Dipartimento del territorio, Divisione dell'ambiente, Sezione della protezione dell'acqua, dell'aria e del suolo.
4. Diese verfahrensleitende Verfügung ist nicht publikumsöffentlich.

Bundesamt für Umwelt



Bettina Hitzfeld
Abteilungschefin

Gegen diese Verfügung kann beim Bundesverwaltungsgericht, Postfach, 9023 St. Gallen, Beschwerde erhoben werden. Die Beschwerde ist innerhalb von 30 Tagen nach Eröffnung der Verfügung einzureichen; die Frist beginnt am Tag nach der Eröffnung der Verfügung zu laufen.

Die Beschwerdeschrift ist im Doppel einzureichen. Sie hat die Begehren, deren Begründung mit Angabe der Beweismittel und die Unterschrift der Beschwerdeführerin bzw. des Beschwerdeführers oder seiner Vertreterin bzw. seines Vertreters zu enthalten. Die angefochtene Verfügung und die als Beweismittel angerufenen Urkunden sind der Beschwerde beizulegen, soweit der Beschwerdeführer bzw. die Beschwerdeführerin sie in Händen hält.

Die Verfügung und die Entscheidungsunterlagen können innerhalb der Beschwerdefrist beim BAFU, Abt. Boden und Biotechnologie, Monbijoustrasse 40, 3011 Bern, zu den üblichen Bürozeiten eingesehen werden. Um telefonische Voranmeldung unter der Nummer 058 462 93 49 wird gebeten.

Zu eröffnen (eingeschrieben):

- Dr. Eleonora Flacio, Settore Ecologia dei vettori, Istituto Microbiologia (IM), Università professionale della Svizzera italiana (SUPSI), Via Flora Ruchat-Roncati 15, 6850 Mendrisio
- Comune di Agno, Ufficio tecnico, Piazza Colonnello Virari 1, 6982 Agno
- Municipio del Borgo di Ascona, Piazza San Pietro 1, Casella postale, 6612 Ascona
- Comune di Balerna, Municipio, Via San Gottardo 90, casella postale, 6828 Balerna
- Città di Bellinzona, Dicastero anziani e ambiente, Settore servizi urbani e ambiente, El Cunevent 3, 6513 Monte Carasso
- Comune di Castel San Pietro, Cancelleria comunale, C.P. 11, Via alla Chiesa 10, 6874 Castel San Pietro
- Comune di Chiasso, Ufficio Ambiente, Via degli Albrici 3a, 6830 Chiasso
- Comune di Coldrerio, Municipio, Via P.F.Mola 17b - C.P. 18, 6877 Coldrerio
- Città di Locarno, Piazza Grande 18, 6600 Locarno
- Comune di Losone, Municipio, CP 863, 6616 Losone
- Città di Lugano, Spazi urbani, Via Sonvica 4A, 6900 Lugano
- Comune di Melide, via S. Franscini 6, 6815 Melide
- Città di Mendrisio, Municipio, Via Municipio 13, 6850 Mendrisio
- Municipio di Muzzano, Cancelleria comunale, Piazza delle Scuole 3, 6933 Muzzano
- Comune di Paradiso, Municipio, Via delle Scuole 23, 6900 Paradiso
- Comune di Riva San Vitale, Ufficio tecnico, c/o Palazzo comunale, Piazza Grande 6, 6826 Riva San Vitale
- Comune di Tenero-Contra, Via Stazione 7, 6598 Tenero
- Canton Ticino, Sezione della protezione dell'acqua, dell'aria e del suolo, Via Franco Zorzi 13, 6500 Bellinzona

Zu eröffnen (elektronisch):

- Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern
- Bundesamt für Landwirtschaft, 3003 Bern
- Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, 3003 Bern
- Eidgenössischen Ethikkommission für die Biotechnologie im Ausserhumanbereich, 3003 Bern
- Eidgenössische Fachkommission für biologische Sicherheit, 3003 Bern

SUPSI

Mendrisio, 14.02.2025

Domanda di licenza (procedura semplificata) per il rilascio sperimentale di invertebrati alieni (artropodi, anellidi, nematodi, platelminti): Valutazione dell'efficacia della tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus* (zanzara tigre asiatica) in diversi ambienti urbani come misura di controllo integrata, nell'ambito del Programma congiunto TDR WHO/IAEA.

Prefazione

Ai sensi dell'Articolo 22 dell'Ordinanza sulla Manipolazione degli Organismi nell'Ambiente (Ordinanza sul Rilascio, RO), ci prendiamo la libertà di richiedere una **procedura semplificata** per ottenere un permesso per il rilascio di maschi sterili di zanzara tigre, poiché un tale rilascio è già stato approvato con la licenza B21002 (BAFU-217.23-64633/7) e la sua successiva estensione per il 2024, ovvero "un rilascio sperimentale con pericoli e danni potenziali comparabili è stato autorizzato in Svizzera, in particolare se riguarda gli stessi organismi".

Di seguito riassumiamo le somiglianze e le differenze tra gli esperimenti.

I maschi sterili per i quali si richiede il permesso di rilascio saranno in tutti gli aspetti simili a quelli utilizzati nell'esperimento di Morcote (2022-2024). Nello specifico, si tratterà di zanzare tigre provenienti dalla colonia stabilita con uova del Canton Ticino, prodotte e irradiate dalla stessa struttura italiana, il Centro Agricoltura e Ambiente, seguendo gli stessi protocolli di produzione e attività di controllo qualità, qui allegati.

I test di qualità e il protocollo di rilascio dei maschi sterili rimarranno invariati. In particolare, è previsto il rilascio di 3'000 maschi sterili per ettaro, due volte a settimana, da maggio a settembre. Anche i metodi di raccolta dati e i periodi di monitoraggio rimarranno gli stessi, utilizzando ovitrappole e trappole per adulti. Tuttavia, non verranno più condotte attività di rilascio-marcatura-ricattura, poiché i dati raccolti con questa tecnica – come distanza percorsa e sopravvivenza – sono coerenti con i risultati di altri esperimenti europei. Inoltre, queste metriche possono essere dedotte dai dati raccolti tramite ovitrappole e trappole per adulti (ad esempio, conteggio dei maschi e distanza dell'effetto).

Un aspetto nuovo e importante dell'esperimento sarà la raccolta di dati sull'età delle femmine. In particolare, si valuterà se il rilascio di maschi sterili impatti non solo il numero di femmine, ma anche la loro età, riducendola. Questo è cruciale per valutare il potenziale impatto sul rischio di trasmissione di patogeni. Dati preliminari suggeriscono un possibile effetto, ma i risultati non sono ancora completi.

Parallelamente all'esperimento, verrà condotta un'indagine approfondita per valutare l'accettazione pubblica e la percezione dell'efficacia della tecnica. Sebbene le interviste condotte come parte del follow-up dell'esperimento di Morcote e numerosi resoconti mediatici suggeriscano che la tecnica sia generalmente ben accettata dal pubblico, intendiamo esplorare questa percezione in modo più dettagliato.

A differenza dell'esperimento precedente, ora prevediamo di operare in aree non territorialmente isolate. Morcote era stata scelta perché confinava con un lago e una montagna, senza una chiara continuità urbana con i comuni vicini. Essenzialmente, era stata selezionata come un sistema "isolato" per valutare se la tecnica potesse avere un effetto sul campo. Tale effetto è stato osservato, come riportato nel rapporto preliminare, ma variava in base alle diverse strutture urbane all'interno del comune (ad esempio, case unifamiliari con giardini, centro urbano, aree di confine con comuni non trattati).

Per questo nuovo esperimento, riteniamo che, per fornire risposte affidabili sull'efficacia della tecnica e valutarne l'idoneità per aree specifiche, sia necessario comprendere come il rilascio di maschi sterili agisca in diversi contesti urbani (urbano, periurbano, campeggi, strutture alberghiere). Pertanto, il nuovo esperimento includerà rilasci in 21 aree con caratteristiche urbane diverse e non isolate da altre zone urbane. Ogni area di rilascio coprirà 12 ettari, rispetto ai 45 ettari utilizzati a

Morcote, con un'ulteriore area di controllo di 12 ettari che circonda ogni zona di rilascio. Tutti i comuni delle aree interessate hanno già concesso l'approvazione per i rilasci.

Verrà inoltre implementato un nuovo modello di analisi dei dati, sviluppato dall'esperienza di Morcote e adottato da altri progetti SIT. Le 21 aree non saranno trattate simultaneamente durante l'esperimento triennale, ma in gruppi di 7. Ogni area fungerà da proprio controllo e verrà confrontata con le altre, al fine di tenere conto di un possibile "effetto anno".

In sostanza, miriamo a valutare l'efficacia della SIT e a determinarne l'impatto a diverse distanze all'interno di differenti strutture urbane.

Riteniamo che la raccolta di questi dati sia essenziale per valutare se la SIT sia una soluzione praticabile in Svizzera. Il nostro obiettivo è fornire ai comuni e ai cantoni indicazioni informate sulla convenienza del rilascio di maschi sterili di zanzara tigre in una determinata area, sia per ridurre il fastidio che per mitigare il rischio di trasmissione di malattie. Una vera valutazione costi-benefici potrà essere condotta una volta che verrà istituita una biofabbrica in grado di produrre per il territorio svizzero.

I rilasci sono previsti in modo sequenziale per gli anni 2025-2027, ma il loro inizio è legato all'approvazione di un progetto sottomesso al fondo nazionale per la ricerca. Qualora, questo però non venisse approvato, dovremmo andare a cercare altrove fondi per effettuare l'esperimento. Vi chiediamo quindi già da adesso la possibilità di estendere il progetto di ulteriori 2 anni (2028 e 2029), sempre secondo le modalità descritte.

1. Informazioni generali

Aedes albopictus, conosciuta anche come zanzara tigre, è una specie alloctona invasiva che si è stabilita nella maggior parte del territorio del Canton Ticino da quasi 20 anni e che, negli ultimi anni, si è espansa in diverse altre regioni svizzere (Figura 1). In molte di queste aree, la specie è già ampiamente insediata, in particolare nelle zone urbane dei Cantoni di Basilea Città, Basilea Campagna, Ginevra, Vallese, nonché nella Mesolcina nel Canton Grigioni, ecc. (www.mosquitoes-switzerland.ch).

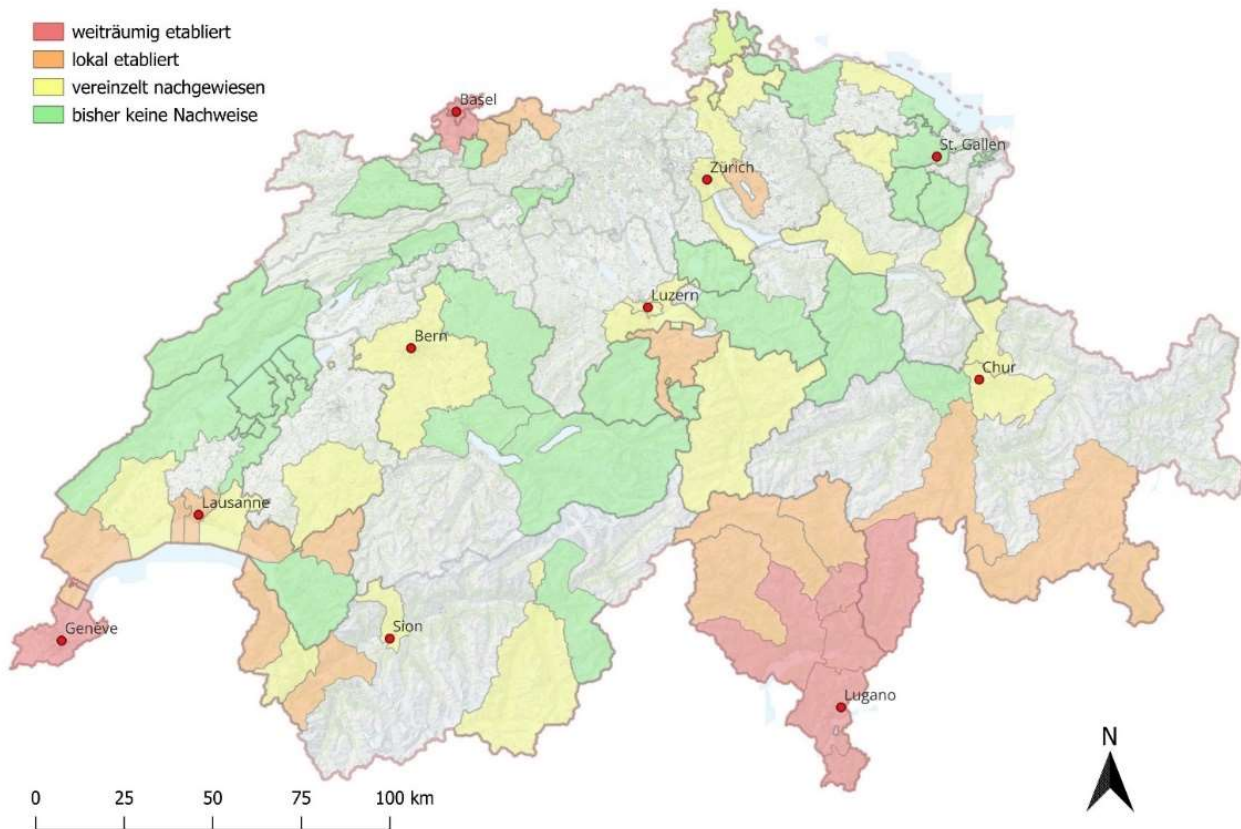


Figura 1. Distribuzione di *Aedes albopictus* in Svizzera nel 2024 (Swiss Mosquito Network)

Questa specie di zanzara è considerata una delle specie invasive più pericolose al mondo per la sua capacità di diffondersi e trasmettere malattie virali esotiche come dengue, chikungunya e Zika. A livello globale, la recrudescenza di focolai di malattie trasmesse da *Aedes* evidenzia le limitazioni dei programmi convenzionali di controllo dei vettori, che si basano principalmente sull'uso di insetticidi e sull'eliminazione dei siti di riproduzione larvale. Le sfide includono lo sviluppo di resistenza agli insetticidi, la presenza di siti di riproduzione criptici, infrastrutture insufficienti o scarso supporto governativo e costi elevati. La zanzara tigre rappresenta inoltre un enorme fastidio per i cittadini, che spesso reagiscono applicando biocidi in modo incontrollato, aumentando così i rischi per la salute e l'ambiente. È quindi urgente sviluppare strategie innovative, sostenibili ed economicamente vantaggiose per il controllo delle zanzare *Aedes*, in particolare *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, i due principali vettori di arbovirus responsabili di oltre il 99% della trasmissione di queste malattie nella popolazione umana.

Nel Canton Ticino, *Ae. albopictus* viene attualmente gestita con risultati soddisfacenti (www.ti.ch/zanzare; www.supsi.ch/go/zanzare) attraverso il controllo larvale e la partecipazione della comunità (Flacio et al. 2015; Ravasi et al. 2021). Finora, grazie anche a un piano d'azione elaborato in collaborazione con l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e coordinato dall'ufficio del medico cantonale, non si sono mai verificati casi di trasmissione locale delle malattie sopra menzionate. Tuttavia, le densità residue della popolazione di zanzare sono stimate essere abbastanza elevate da costituire un potenziale rischio di trasmissione di malattie esotiche (Ravasi et al. 2020). Inoltre, è difficile mantenere costante l'impegno della popolazione e individuare tutti i siti di riproduzione della zanzara tigre, poiché molti di essi sono criptici.

Valutazione dell'efficacia della tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus* (zanzara tigre asiatica) in diversi ambienti urbani come misura di controllo integrato nell'ambito del programma Join TDR OMS/IAEA.

TDR (il Programma Speciale per la Ricerca e la Formazione sulle Malattie Tropicali, co-sponsorizzato da UNICEF, UNDP, la Banca Mondiale e l'OMS), insieme all'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica (IAEA), incoraggia fortemente l'applicazione della Tecnica dell'Insetto Sterile (Sterile Insect Technique, SIT) alle zanzare, poiché i biocidi tradizionali stanno perdendo efficacia a causa della resistenza, mentre la SIT è un sistema di controllo mirato, senza impatti noti sull'ambiente o sulla salute (Bouyer 2024). La SIT è una tecnica di controllo genetico ampiamente utilizzata negli ultimi 60 anni per prevenire, sopprimere o eradicare insetti nocivi di rilevanza agricola, sanitaria e veterinaria (Bouyer 2024). In questa tecnica, sono le stesse zanzare a cercare altre zanzare.

La SIT prevede l'allevamento massivo della specie bersaglio in strutture dedicate, la separazione dei maschi dalle femmine, la sterilizzazione dei maschi tramite radiazioni e il loro rilascio nell'ambiente. I maschi sterili non pungono e competono attivamente per l'accoppiamento con le femmine selvatiche vergini. Il rilascio continuo di un numero sufficiente di maschi sterili è in grado di ridurre il tasso di riproduzione della popolazione bersaglio sul campo. L'esposizione a radiazioni ionizzanti mutageniche è stata il metodo più utilizzato e sicuro per rendere sterili gli insetti, senza alcuna evidenza di resistenza anche nel lungo periodo. Secondo lo Standard Internazionale per le Misure Fitosanitarie n. 3 della Convenzione Internazionale per la Protezione delle Piante (FAO 2005), gli insetti sterili sono classificati come organismi benefici, poiché la SIT è tra i metodi di controllo degli insetti più ecologici mai sviluppati. Inoltre, secondo l'Allegato 1.3.a. dell'Ordinanza 814.911, i maschi radio-sterilizzati ottenuti mediante processo mutagenico non sono considerati organismi geneticamente modificati.

In Europa, la resistenza agli adulticidi si sta diffondendo rapidamente. In Svizzera, i biocidi adulticidi non vengono utilizzati regolarmente nelle attività di controllo, ma sono necessari in caso di misure straordinarie per contrastare un rischio di trasmissione di malattie. Tuttavia, se il pubblico non utilizza questi biocidi, sempre più cittadini installano dispositivi automatici che li applicano, aumentando così il rischio di insorgenza di resistenza. La tecnica SIT potrebbe essere uno strumento utile per ridurre questo rischio. Attualmente, la SIT è ancora costosa, ma le strutture di produzione su larga scala stanno migliorando costantemente e i costi si stanno riducendo ogni anno (Bouyer 2024).

La SUPSI ha già realizzato un progetto di questo tipo nel comune di Morcote (Canton Ticino) negli anni 2022-2024: Applicazione pilota della tecnica dell'insetto sterile contro *Aedes albopictus* (zanzara tigre asiatica) in Canton Ticino nell'ambito del Programma Join TDR OMS/IAEA (si veda il rapporto preliminare allegato). Lo scopo di questo progetto, realizzato su sollecitazione dell'OMS, è stato quello di verificare se l'applicazione di maschi sterili di zanzara tigre nell'ambito del sistema di lotta integrata già applicato in Canton Ticino possa portare a un'ulteriore diminuzione della presenza dell'insetto, e di valutare quale significato abbia sia in termini di fastidio per i cittadini che di rischio di trasmissione di malattie. Il test effettuato nel 2022 ha rappresentato un primo approccio preliminare alla tecnica. Ha permesso di comprendere tutti gli aspetti tecnici e scientifici fondamentali del metodo e ha confermato l'assenza di problemi logistici significativi. Nel 2023, abbiamo rilasciato maschi sterili su un'area target di 45 ettari (e in più di 70 punti di rilascio) e per tutta la stagione di attività della zanzara tigre (circa 150'000 maschi sterili rilasciati settimanalmente). Lo stesso esperimento è stato ripetuto nel 2024, poiché è stato dimostrato che il SIT ha una maggiore efficacia se i rilasci vengono effettuati per due anni di seguito. Si tratta del più grande progetto realizzato in Europa con l'integrazione del SIT nelle normali attività di controllo e sorveglianza dei vettori già esistenti e consolidate. A differenza degli altri progetti, non sono state condotte attività preliminari speciali ed eccezionali (ad esempio, porta a porta) per ridurre la densità di popolazione e il numero di siti riproduttivi, dando così risultati che producono indicazioni chiare per le parti interessate e i responsabili delle decisioni sul reale beneficio che questa tecnica potrebbe apportare al controllo dei vettori con la sua stabile integrazione nel piano di controllo nazionale svizzero per *Ae. albopictus*.

Inoltre, a differenza di altri, abbiamo raccolto dati anche sulle femmine adulte, un aspetto di fondamentale importanza per la valutazione dell'efficacia del SIT. I risultati sono notevoli, con una diminuzione sia delle uova (51-59%) che degli adulti (65-67%) nell'area target. Molto importante è il fatto che l'accettazione da parte del pubblico è stata più che soddisfacente. L'interesse è stato notevole, con oltre 50 apparizioni sui media (televisione, radio, giornali) in Svizzera, senza alcun commento negativo. Inoltre, alcuni comuni e diversi cantoni si aspettavano che la tecnica venisse adottata subito nel sistema di sorveglianza e controllo regolare. Infatti, i cantoni di Basilea Città e dei Grigioni hanno contribuito al finanziamento del progetto per tutti e 3 gli anni della sperimentazione. È importante notare che i test su piccola scala si sono rivelati un'ottima prova per identificare gli aspetti chiave che devono essere migliorati per estendere l'intervento ai programmi SIT operativi.

L'esperimento a Morcote non ha presentato problemi di sicurezza né per l'uomo né per l'ambiente: i maschi rilasciati sono sopravvissuti solo pochi giorni e il loro movimento attivo è rimasto nell'area dell'esperimento. L'esperimento si è rivelato efficace anche in aree solitamente critiche, come le case di campagna, normalmente mal gestite dai proprietari. Sebbene la zanzara tigre fosse ancora rilevabile con le trappole, i cittadini di Morcote ci hanno riferito di aver trascorso due estati tranquille "senza punture". Si sono invece riscontrati problemi di drastica riduzione della qualità dei maschi durante il trasporto con DHL o simili dall'Italia, dove vengono prodotti, e si è osservata anche una differenza di efficacia a seconda delle diverse strutture abitative presenti. Riteniamo che sia necessario valutare meglio questi aspetti prima di poter raccomandare o meno questa tecnica ai potenziali utilizzatori finali, qualora venisse accettata sul territorio svizzero come misura di controllo integrato della zanzara tigre.

Pertanto, il test su piccola scala effettuato a Morcote si è rivelato un'ottima prova per identificare gli aspetti chiave che devono essere migliorati per scalare l'intervento a programmi SIT operativi (Bouyer et al. 2020, Bouyer 2024). Attualmente, abbiamo richiesto una sovvenzione federale per la ricerca (SNSF) che ci permetterà di continuare gli studi che contribuiranno a concretizzare nel prossimo futuro l'implementazione del SIT come futura misura di controllo integrato contro *Aedes albopictus*, migliorando la nostra capacità di gestire questa specie senza danneggiare l'ambiente, la salute umana o animale.

Sono molti i temi toccati dalla nostra richiesta al FNS, come il miglioramento delle tecniche di produzione e trasporto, l'analisi automatizzata per il riconoscimento delle uova di zanzara invasiva e la valutazione della loro fertilità o meno, la valutazione dell'impatto sull'età delle femmine, un aspetto importante per valutare il reale impatto della tecnica sul rischio di trasmissione di malattie, la percezione pubblica della tecnica SIT. Il progetto presentato richiede comunque l'autorizzazione al rilascio, perché prevede di effettuare rilasci in diverse aree per i prossimi 3 anni, con l'obiettivo di testare e fornire metodi aggiornati per verificare l'efficacia del SIT, dalla progettazione degli esperimenti alla raccolta e analisi dei dati. Utilizzando il Ticino come campo di prova, valuteremo le prestazioni in campo dei maschi sterili di *Ae. albopictus* in aree antropizzate non isolate con caratteristiche diverse, che rispecchiano le esigenze che un utente può avere.

1.1 Nome e indirizzo del richiedente (azienda o istituzione)

Settore Ecologia dei Vettori, Istituto di Microbiologia (IM)
Scuola Universitaria Professionale della Svizzera Italiana (SUPSI)
Via Flora Ruchat-Roncati 15
CH-6850 Mendrisio

1.2 Nome, qualifiche ed esperienza dello scienziato responsabile

La Dr Eleonora Flacio è una biologa ecologa specializzata in entomologia medica, responsabile del Settore Ecologia dei Vettori presso IM/SUPSI e incaricata del sistema di sorveglianza della zanzara tigre nel Canton Ticino sin dalla sua istituzione nel 2000. Dal 2017 è responsabile del centro di coordinamento dello *Swiss Mosquito Network* (progetto sotto la supervisione dell'Ufficio federale dell'ambiente, FOEN).

È formatrice per la sorveglianza e il controllo delle zanzare invasive per la *European Mosquito Control Association* (EMCA), per l'*International Atomic Energy Agency* (IAEA), per la *European Society for Vector Ecology* e per *Aedes Invasive Mosquitoes COST*. È inoltre esperta nella determinazione delle zanzare invasive per il progetto europeo *Mosquito Alert* e per *Swiss Info Fauna*.

Per l'EMCA (<https://www.emca-online.eu/>), ha partecipato alla stesura delle linee guida europee per il controllo urbano delle zanzare, è stata membro del consiglio direttivo per diversi anni ed è attualmente presidente eletta.

Negli ultimi anni, ha partecipato come esperta ai workshop internazionali di TDR/WHO e IAEA sulla *Sterile Insect Technique* (SIT) e ha recentemente organizzato alla SUPSI, su incarico di TDR/WHO, un evento collaterale sulla SIT e la comunicazione, intitolato "*Communication on the Sterile Insect Technology (SIT) against Aedes vectors to control Aedes-borne diseases.*"

2 Identità e caratterizzazione degli organismi

2.1 Nomi scientifici e comuni

Aedes albopictus (*Stegomyia albopicta*) (Skuse, 1894), della famiglia dei Culicidi, noto anche come zanzara tigre asiatica o zanzara della foresta.

2.2 Dati tassonomici, inclusi sottospecie, ceppo o biotipo

Le zanzare tigre irradiate provengono da campioni di uova di zanzara tigre raccolti nel Canton Ticino negli anni 2019-2020 mediante ovitrappole nei comuni di Muzzano (coordinate: CH1903+ / LV95 2'714'083.0, 1'094'923.5) e Vacallo (coordinate: CH1903+ / LV95 2'723'799.4, 1'078'217.7).

L'irradiazione provoca mutazioni dominanti letali casuali e danni gonadici significativi che portano alla sterilità delle zanzare, senza alcuna manipolazione genetica.

2.3 Conferma dei dati tassonomici da parte di un'autorità scientifica riconosciuta e nome e indirizzo dell'istituzione in cui sono archiviati gli esemplari di riferimento

Le zanzare tigre sterili utilizzate possono essere identificate con qualsiasi chiave di determinazione delle zanzare europee (Becker et al., 2010).

Non si osservano modifiche morfologiche nella specie dopo l'irradiazione. Campioni locali selvatici di questi ceppi di zanzara sono conservati presso il Settore Ecologia dei Vettori dell'IM/SUPSI.

La Dr E. Flacio è un'esperta europea nella determinazione delle zanzare invasive.

Valutazione dell'efficacia della tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus* (zanzara tigre asiatica) in diversi ambienti urbani come misura di controllo integrato nell'ambito del programma Join TDR OMS/IAEA.

2.4 Marcatori fenotipici e genetici e descrizione dei metodi per identificare inequivocabilmente gli organismi nell'ambiente

Si rimanda alla sezione 2.3 per i marcatori fenotipici.

Oltre alla sterilità indotta, le mutazioni casuali indotte nei maschi sterili non possono essere geneticamente distinte dalle popolazioni naturali. Non siamo a conoscenza di alcun metodo o tecnologia in grado di discriminare geneticamente i maschi irradiati da quelli non irradiati.

2.5 Metodi di coltura e produzione degli organismi

Le zanzare sterili di *Aedes albopictus* saranno importate dal *Centro Agricoltura Ambiente "G. Nicoli" srl (CAA)* di Crevalcore (Bologna, Italia), che gestisce una struttura di produzione su larga scala di livello di biosicurezza 2 (BLS2).

Tutte le procedure necessarie per la produzione dei maschi sterili sono definite nella SOP allegata. Il CAA si trova a circa 250 km a sud dei siti di sperimentazione nel Canton Ticino e ha una capacità produttiva di circa un milione di maschi sterili a settimana.

2.6 Fonte precisa e purezza dei ceppi e biotipi destinati all'esperimento, nonché nome e indirizzo dell'organizzazione che alleva gli insetti e informazioni precise sul sito (longitudine e latitudine, altitudine, habitat, ospiti) e sulle stagioni di raccolta sul campo

Il ceppo utilizzato per la sperimentazione è ottenuto da uova di *Aedes albopictus* raccolte sul campo in Svizzera (vedi sezione 2.2).

Il ceppo (*CH strain*) viene allevato su larga scala presso la struttura del CAA. I maschi sterili irradiati vengono ottenuti mediante esposizione a radiazioni ionizzanti nella fase pupale, che induce mutazioni casuali nelle linee germinali.

2.7 Regioni in cui gli organismi sono già stati rilasciati deliberatamente o accidentalmente ed esperienza acquisita

La tecnica dell'insetto sterile (SIT) è stata sviluppata diversi decenni fa e ha ottenuto numerosi successi nel controllo dei parassiti degli insetti. Più recentemente, la SIT è stata proposta per la soppressione delle zanzare nell'ambito di un approccio di *Integrated Vector Management (IVM)*. Questa tecnica è ecocompatibile, mirata specificamente alla specie bersaglio, limitata spazialmente e non persistente, caratteristiche che contribuiscono a proteggere la salute pubblica, la fauna non bersaglio e l'ambiente.

A partire dagli anni '30, la SIT è stata progressivamente applicata in agricoltura, contribuendo alla gestione di almeno 20 specie chiave di parassiti degli insetti. Le prime applicazioni efficaci della SIT contro le zanzare risalgono agli anni '60 e '70, con sperimentazioni pilota contro *Culex quinquefasciatus* e i vettori della malaria *Anopheles quadrimaculatus* in Florida (USA) e *An. albimanus* in El Salvador (America Centrale).

Valutazione dell'efficacia della tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus* (zanzara tigre asiatica) in diversi ambienti urbani come misura di controllo integrato nell'ambito del programma Join TDR OMS/IAEA.

Lo sviluppo e il miglioramento delle fasi tecniche hanno portato a un rinnovato interesse internazionale per l'uso della SIT contro alcune delle principali specie vettori di *Plasmodium spp.* (malaria) (*An. arabiensis*) e del virus dengue (*Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*). Oggi sono stati condotti test pilota su diversi continenti (Dyck et al. 2005; Oliva et al. 2021; Bouyer 2024).

Dall'ultima richiesta di rilascio, presentata nel 2021 e approvata nell'aprile 2022 (B21002), il numero di progetti sulla sterilizzazione maschile è aumentato a livello globale, dimostrando l'interesse e la necessità di valutare questa tecnica per ridurre l'incidenza delle malattie trasmesse dalle zanzare. In molte parti del mondo, infatti, oltre a non essere ecocompatibili, gli adulticidi utilizzati non sono più efficaci a causa delle resistenze sviluppate in seguito al loro utilizzo continuato. La tecnica del maschio sterile, applicata nella sua forma più semplice come in questo progetto, ossia senza l'aggiunta di batteri o biocidi, permette di evitare tali effetti.

Una spiegazione aggiornata della tecnica SIT e dei risultati ottenuti a livello globale è disponibile nella recente revisione di Jeremie Bouyer (2024). In particolare, la Tabella 1 del materiale supplementare elenca i 39 progetti attivi fino a febbraio 2024 e la loro adesione all'approccio condizionato a fasi per la sperimentazione della SIT (*phase conditional approach to testing SIT – PCA*). Sia l'articolo che il materiale supplementare sono allegati a questo documento.

A seguito delle sperimentazioni condotte tra il 2022 e il 2024, abbiamo completato la fase 2 dei PCA e la nostra richiesta riguarda il passaggio alla fase 3, ovvero la fase di ricerca prima dell'applicazione operativa, in cui la tecnica SIT può essere implementata come misura di controllo integrata.

Allegiamo inoltre a questo documento il rapporto sintetico sulla sperimentazione SIT 2022-2024 (*Rapporto SIT 2022-2024*). Sono in fase di preparazione due articoli con un'analisi statistica approfondita dei dati raccolti. Di seguito forniamo un riepilogo dei dati raccolti:

Maschi sterili rilasciati:

- La presenza residua di femmine nelle zanzare rilasciate è stata dello 0,41% nel 2022 (dati MRR), 0,33% nel 2023 (dati MRR) e 0,60% nel 2024 (dati di laboratorio prima della spedizione), tutte misure inferiori all'1%, come indicato nelle linee guida WHO-IAEA per la sperimentazione della SIT sul campo (WHO IAEA 2020).
- Il tasso di mortalità dopo il trasporto è stato del 43% quando la spedizione con DHL ha superato le 24 ore, mentre è stato solo del 2,1% con trasporto diretto via auto (3 ore).
- Distanza media percorsa: 69 m nel 2024 e 97,3 m nel 2023. In base ai dati raccolti, si stima che l'80% dei maschi rilasciati abbia coperto una superficie di 100 m e solo il 18% si sia spinto oltre i 100 m fino a un massimo di 200 m.
- Distanza massima percorsa: 115,8 m nel 2024 e 184,4 m nel 2023.
- Aspettativa di vita media: 2,18 giorni.
- Tasso di sopravvivenza giornaliero: 0,63.
- Fertilità residua: 0,03% (irradiazione a 40 Gy) e 0,3% (irradiazione a 35 Gy) rispetto a una fertilità naturale del 96,2%.

Riduzione delle zanzare:

- Sterilità indotta nelle uova: 18%.
- Riduzione della densità delle uova: 54,8%.
- Riduzione delle femmine adulte: 64,9%.

Essendo un paese donatore, non abbiamo potuto ricevere i fondi europei nell'ambito del progetto RER5026 *Enhancing the Capacity to Integrate Sterile Insect Technique in the Effective Management of Invasive Mosquitoes*, ma abbiamo partecipato agli incontri di scambio.

I dati raccolti sui rilasci di maschi sterili di *Ae. albopictus*, relativi a sopravvivenza, dispersione e trasporto, sono in linea con quelli di altri progetti europei. Tuttavia, diversamente dagli altri progetti europei, quello condotto in Canton Ticino è stato l'unico a svolgersi per l'intera stagione, per due stagioni consecutive, senza l'aggiunta di altri componenti (batteri o biocidi) e, soprattutto, senza ulteriori misure di controllo.

Negli altri progetti, infatti, sono state attuate misure ad hoc di rimozione dei siti di riproduzione e trattamenti larvicidi nell'area dell'esperimento. In Canton Ticino, invece, la tecnica SIT è stata applicata come complemento al sistema di controllo integrato già esistente, senza miglioramenti aggiuntivi.

Riteniamo che solo in questo modo sia possibile valutare se questa tecnica possa realmente fornire risultati interessanti per un sistema esteso di controllo della zanzara tigre, come quello in atto in Ticino e in molti altri cantoni.

2.8 Biologia ed ecologia

2.8.1 Diffusione naturale dell'organismo

La zanzara tigre è presente in tutte le aree urbanizzate del fondovalle del Canton Ticino. È nelle aree urbanizzate che trova i suoi luoghi di riproduzione, ovvero piccole raccolte d'acqua fornite da tombini, piccoli contenitori, ecc. (www.ti.ch/go/zanzare). L'adulto si allontana solo di pochi metri dal luogo di riproduzione (il suo raggio d'azione è stimato in meno di 100 m/anno). Le femmine possono entrare nei veicoli seguendo il loro ospite, disperdendosi così passivamente per diversi chilometri. Nel caso di un rilascio di maschi sterili, questi cercano le femmine già presenti nel territorio e la loro capacità di volo è stata determinata in poche centinaia di metri dal punto di rilascio (Bellini et al. 2010). Questi dati di Bellini sono stati da noi confermati nei 7 esperimenti di marcatura-rilascio-ricattura condotti a Morcote dal 2022 al 2024 (vedi sezione 2.7).

2.8.2 Ruolo e significato degli organismi nell'ecosistema di origine

La zanzara tigre in Canton Ticino rappresenta un fastidio per i cittadini a causa delle sue ripetute punture durante il giorno. Rappresentano inoltre un potenziale vettore di malattie come la dengue e la chikungunya, se importate (Fouque et al. 2020; Ravasi et al. 2020). Le zanzare maschio non pungono, quindi il rilascio di maschi sterili non rappresenta un problema sanitario. La tecnologia di separazione dei sessi disponibile per *Aedes* consente di separare i maschi dalle femmine con una precisione superiore al 99% di specificità. La presenza residua di femmine irradiate, che possono essere accidentalmente rilasciate insieme ai maschi, è completamente sterile, ma mantiene la sua attività di puntura antropofila. Tuttavia, la progressiva riduzione della densità della popolazione target di *Ae. albopictus* durante il picco naturale di presenza (agosto-settembre) minimizza fortemente questi rilasci accidentali, come confermato dagli esperimenti di Morcote, con una riduzione nei mesi di picco del 75,4%. Inoltre, nonostante l'eventuale presenza residua di femmine, queste vengono rilasciate insieme a un numero massiccio di maschi e si verifica un fenomeno di "molestie sessuali" in cui i maschi molestano costantemente le femmine vicine tentando di accoppiarsi con loro (Bouyer 2024). Questo fa sì che le femmine smettano di nutrirsi e di mordere o può addirittura portare a una riduzione della loro longevità. La zanzara tigre del Canton Ticino non ha un ruolo essenziale nell'ecosistema perché non influisce in modo significativo sulla catena alimentare di altri organismi

(ad esempio uccelli e ragni). Il rilascio di maschi sterili sarà integrato nella campagna standard di controllo dei vettori applicata contro *Ae. albopictus*, che prevede l'uso di biocidi larvicidi. I metodi SIT si combinano bene con qualsiasi altro metodo di controllo vettoriale, poiché non si rivolgono specificamente ai maschi sterili rispetto ai maschi selvatici. I metodi mirati agli stadi immaturi o alle femmine adulte sarebbero particolarmente compatibili, anzi sinergici, con i metodi SIT (Alphey et al., 2010). L'introduzione di biocidi selettivi ed ecologicamente sostenibili è stata approvata in Ticino per il programma di sorveglianza e controllo delle zanzare grazie al suo minimo impatto ambientale.

2.8.3 Descrizione della biologia, in particolare della loro riproduzione, delle modalità di diffusione biologica e dei requisiti relativi all'ospite, all'habitat e al clima degli organismi e dei loro possibili ospiti

I maschi di zanzara irradiati sono in grado di sopravvivere e disperdersi nell'ambiente naturale, accoppiandosi efficacemente con le femmine selvatiche della stessa specie. Le femmine selvatiche accoppiate con maschi sterili non possono produrre uova vitali, portando così a un declino della popolazione. Tuttavia, queste femmine possono mantenere una fertilità residua inferiore all'1%. La progenie che potrebbe eventualmente essere prodotta è stata segnalata come avente una fitness fortemente ridotta (Shetty et al., 2016).

La tecnica tradizionale dell'insetto sterile (SIT) ha una lunga storia di utilizzo sicuro, inclusa l'applicazione contro insetti che colpiscono i mammiferi, come il verme della vite del Nuovo Mondo, oltre che contro parassiti delle colture. Le linee di insetti sterilizzati tramite radiazioni non contengono segmenti di DNA aggiuntivi che codifichino per tossine o prodotti genici tossici, né componenti che conferiscano un vantaggio selettivo a qualsiasi insetto o microbo che potrebbe in qualche modo acquisire tutto o parte di questo DNA (Alphey et al., 2010).

Le femmine irradiate che potrebbero essere accidentalmente rilasciate insieme ai maschi sono completamente sterili. Non esistono rischi di diffusione biologica associati al rilascio di zanzare sterili. La durata media della vita di una zanzara adulta sterile in estate è stimata essere inferiore a 2 settimane (Bellini et al., 2010).

2.8.4 Descrizione degli organismi testati come ospiti e metodi di indagine sulla specificità dell'ospite

Come altre specie di zanzare, solo le femmine necessitano di un pasto di sangue per sviluppare le uova. Oltre a questo, si nutrono di nettare e altri succhi vegetali dolci, proprio come i maschi. I picchi di attività variano, ma per la maggior parte del tempo riposano durante le ore del mattino e della notte. Cercano i loro ospiti sia all'interno che all'esterno delle abitazioni umane, ma sono particolarmente attive all'aperto. Le loro punture non sono necessariamente dolorose, ma risultano più percepibili rispetto a quelle di altre zanzare. Le zanzare tigre tendono generalmente a pungere un ospite più volte, se ne hanno la possibilità. *Aedes albopictus* può pungere anche altri mammiferi oltre agli esseri umani, così come gli uccelli (Hawley, 1988). Il maschio sterile di *Aedes albopictus* non ha quindi organismi ospiti.

2.8.5 Descrizione dei possibili organismi associati (nemici naturali, patogeni, commensali) e metodi per la loro eliminazione

La predazione naturale delle zanzare tigre nel Canton Ticino è praticamente nulla. Il numero di uccelli che se ne nutrono non è significativo. L'IM/SUPSI ha condotto analisi genetiche delle feci

degli uccelli, in collaborazione con l'associazione Ficedula, per cercare di dimostrare la predazione, ma non ha trovato prove a supporto (risultati di un progetto preliminare interno dell'IM). (Vedere sezione 2.8.2).

2.8.6 Resistenze o sensibilità particolari (freddo, siccità, prodotti fitosanitari, ecc.)

I maschi sterili verranno rilasciati durante la stagione naturale di attività della zanzara tigre in Canton Ticino (maggio-ottobre). Questi maschi presentano le stesse caratteristiche delle zanzare tigre locali, da cui derivano dopo il processo di radio-sterilizzazione. (Vedere sezione 2.8.3).

2.8.7 Distribuzione geografica attuale

I maschi sterili di zanzara tigre vengono prodotti a partire da zanzare tigre del Canton Ticino, dove la specie è già presente in tutta la zona di pianura.

2.8.8 Persistenza e moltiplicazione nelle condizioni della Svizzera

I maschi adulti di *Aedes albopictus* sono sterili e hanno una durata media della vita inferiore a una settimana nelle condizioni climatiche del Canton Ticino, come confermato nei sette esperimenti di marcatura-rilascio-ricattura condotti a Morcote tra il 2022 e il 2024, che hanno rilevato un'aspettativa di vita media di 2,18 giorni (vedere sezione 2.7).

2.8.9 Informazioni sul comportamento invasivo in altre aree da parte degli organismi stessi o di organismi strettamente correlati

Le zanzare tigre non irradiate sono considerate tra gli organismi invasivi più efficaci, avendo conquistato la maggior parte dei continenti ed essendo in continua espansione. Si sono spostate prevalentemente tra i continenti nelle loro forme giovanili (uova e larve), mentre gli adulti, entrando clandestinamente nei veicoli, hanno potuto spostarsi facilmente tra le nazioni ([ECDC](#)). Anche le zanzare irradiate potrebbero entrare nei veicoli da adulte, ma poiché non possono riprodursi e vivono meno di una settimana (vedi sezione 2.7), non vi è alcun rischio di diffusione invasiva.

3 Esecuzione del rilascio sperimentale

3.1 Descrizione del rilascio sperimentale, inclusi i metodi e la quantità di organismi da rilasciare

I maschi sterili di *Aedes albopictus* verranno rilasciati a livello del suolo. I rilasci saranno effettuati per coprire l'intera stagione delle zanzare, ossia 5 mesi all'anno in Canton Ticino. La dose adeguata di maschi sterili da rilasciare può essere stimata in base alla densità della popolazione locale di zanzare, monitorata con metodi standard come le ovitrappole. Si ritiene necessario mantenere un rapporto tra maschi sterili e maschi selvatici compreso tra 5:1 e 10:1 durante la stagione per ottenere un impatto significativo sulla popolazione bersaglio. La quantità effettiva di maschi sterili da rilasciare dipende anche dalla qualità dei maschi sterili e dalle condizioni ambientali. Pertanto, per ottenere un impatto efficace sulla fertilità naturale, le dosi di rilascio verranno modulate in base ai dati raccolti dalle stazioni di monitoraggio sul campo.

La densità della popolazione locale di maschi selvatici può essere stimata sulla base della relazione tra il numero medio di uova raccolte dalle ovitrappole sul campo e la densità dei maschi adulti misurata direttamente nell'area di studio mediante metodi di campionamento degli adulti o analisi

della raccolta su atterraggio umano (HLC). In uno studio condotto in Italia, la relazione tra il numero di maschi selvatici per ettaro (Mw) e il numero di uova per ovitrappola a settimana (ECAA7) è stata definita dalla formula:

$$MW = 3,45 * ECAA7,$$

dove ECAA7 rappresenta il numero di uova per ovitrappola per settimana (Carrieri et al., 2017).

Il numero di maschi sterili da rilasciare può quindi essere determinato in base alla stima della densità della popolazione naturale, che ovviamente può variare nel corso della stagione.

Nei villaggi di studio proposti in Svizzera, seguendo il numero medio di uova per ovitrappola per settimana osservato negli ultimi anni, il numero previsto di maschi sterili da rilasciare settimanalmente varierà tra 1000 e 3000 maschi/ha/settimana, al fine di raggiungere un rapporto tra maschi sterili e fertili compreso tra 5:1 e 10:1 nell'arco dell'intera settimana.

La definizione della periodicità più conveniente per i rilasci dipenderà dalla sopravvivenza giornaliera dei maschi sterili, che è correlata alla temperatura e all'umidità relativa. Tuttavia, nei test condotti a Morcote, è stato osservato che è consigliabile effettuare i rilasci due volte a settimana, poiché i maschi di solito non sopravvivono più di una settimana ed è necessario mantenere densità adeguate affinché possano competere con successo per accoppiarsi con le femmine selvatiche.

Il numero di maschi sterili presenti in un determinato giorno sarà stimato tenendo conto del numero di maschi sterili rilasciati nell'ultima immissione, secondo il tasso di sopravvivenza maschile (SR), in funzione dell'umidità relativa (RH), come descritto in Bellini et al. (2010) utilizzando la seguente equazione:

$$SR = 0,02 RH - 0,48$$

Questa equazione è considerata valida per un intervallo di RH compreso tra 48% e 72,5%; al di sopra del 72,5%, si assume che SR sia pari al 97%, mentre al di sotto del 48%, si assume che SR sia pari al 52%.

Oltre alla stima indiretta sopra proposta, le densità della popolazione selvatica di maschi e femmine di *Aedes albopictus* possono essere stimate direttamente tramite raccolta su atterraggio umano o metodi di trappolaggio degli adulti, nell'ambito di una sorveglianza dedicata condotta nelle aree di studio, seguendo una metodologia dettagliata in FAO/IAEA (2020).

Non verranno implementati ulteriori test di Marcatura, Rilascio e Ricattura (MRR) con questo esperimento, poiché abbiamo già raccolto dati sufficienti con PCA 2, e i nostri risultati si sono dimostrati in linea con quelli raccolti da altri progetti europei.

In assenza di uno studio MRR, il rapporto tra maschi e femmine (M/F) nelle aree di rilascio e di controllo può essere calcolato e confrontato per determinare il rapporto tra maschi sterili e selvatici nell'area di rilascio per ogni settimana di monitoraggio delle uova, utilizzando l'equazione:

$$RS/W = [(Ms + Mw) / Fw] \div (Fc/Mc) - 1,$$

dove:

- RS/W è il rapporto tra maschi sterili e selvatici;

- Ms, Mw e Fw sono rispettivamente il numero di maschi sterili, maschi selvatici e femmine selvatiche raccolti nell'area di rilascio;
- Fc e Mc sono rispettivamente il numero di femmine e maschi raccolti nell'area di controllo (Bellini et al., 2020).

I rilasci dei maschi sterili saranno effettuati in aree pubbliche all'aperto, distanziati di circa 80-100 metri in zone semiombreggiate. I maschi sterili voleranno via nei 15 minuti successivi al rilascio e poi "scompariranno". La mortalità in campo verrà determinata dopo un'ora, contando i maschi che non hanno preso il volo nei punti di rilascio.

3.2 Calendario sperimentale

Lo studio SIT sul campo sarà condotto per tre anni (2025, 2026 e 2027) durante la stagione attiva delle zanzare, da maggio a ottobre. La ricerca sarà svolta in 21 siti distribuiti nei quattro distretti del Canton Ticino (Mendrisio, Lugano, Bellinzona e Locarno) con le maggiori densità di *Ae. albopictus*.

Nota bene: lo studio è previsto sui tre anni 2025-27 qualora arrivasse a fine marzo 2025 la conferma dei finanziamenti. Altrimenti bisognerà cercare i finanziamenti altrove. Si richiede quindi di poter estendere il permesso di ulteriori 2 anni qualora si dovesse spostare l'inizio del progetto effettuando comunque i rilasci con le stesse modalità .

I rilasci dei maschi sterili saranno effettuati due volte a settimana, con una dose definita nel paragrafo 3.1. Tuttavia, le attività di sorveglianza e raccolta dati si estenderanno per un periodo più lungo (aprile-novembre) per raccogliere informazioni sia prima che dopo l'"effetto" del trattamento.

I siti verranno progressivamente trattati con il metodo SIT seguendo la pianificazione riportata nella Tabella 1:

2025 → 7 siti saranno trattati, mentre 14 fungeranno da controllo.

2026 → i 7 siti di controllo del 2025 saranno trattati, portando a 14 siti trattati.

2027 → i 7 siti di controllo del 2025 e 2026 saranno trattati, mentre i 7 siti trattati nel 2025 e 2026 non verranno più trattati ma solo monitorati.

L'idea alla base di questo design sperimentale è che ogni sito possa essere inizialmente un controllo e successivamente un trattato.

Per i 7 siti trattati nel primo anno (2025), i dati di controllo vengono già raccolti nel 2024. Questo implica che ogni sito può fungere da proprio controllo, riducendo la variabilità tra siti e tra ovitrappole utilizzate per misurare la densità delle uova in un sito.

Un altro vantaggio di questo design è che ci permette di separare l'effetto dell'anno di calendario (2025, 2026 e 2027) dall'effetto dell'anno di trattamento (primo e secondo anno di trattamento). Questo è un nuovo approccio di analisi dei dati per esperimenti SIT, sviluppato in collaborazione con la società Zurich Data Scientists (www.zurich-data-scientists.ch).

Secondo la nostra valutazione, questo metodo ottimizza il grande sforzo richiesto per la raccolta dei dati sul campo e riduce la loro variabilità legata all'anno di raccolta. Anche il progetto SIT Tahiti si è mostrato interessato a questo nuovo metodo di analisi e ci ha contattato per maggiori dettagli.

Per ulteriori informazioni sull'analisi dei dati, si rimanda al rapporto redatto per il Comitato svizzero di esperti per la biosicurezza in allegato.

Site	Region	Municipality	Type	2025	2026	2027
1	Mendrisiotto	Chiasso	Urban with buildings	Release SIT	Release SIT	Control
2	Mendrisiotto	Balerna	Old town + residential	Release SIT	Release SIT	Control
3	Mendrisiotto	Coldrerio	Old town + residential	Control	Release SIT	Release SIT
4	Mendrisiotto	Castel San Pietro	Residential	Control	Control	Release SIT
5	Mendrisiotto	Mendrisio	Urban with buildings	Control	Release SIT	Release SIT
6	Mendrisiotto	Riva San Vitale	Old town + residential	Control	Control	Release SIT
7	Luganese	Melide	Old town + residential	Release SIT	Release SIT	Control
8	Luganese	Paradiso	Urban with buildings	Control	Release SIT	Release SIT
9	Luganese	Lugano (Viganello)	Urban with buildings	Release SIT	Release SIT	Control
10	Luganese	Lugano (Breganzona)	Old town + residential	Control	Release SIT	Release SIT
11	Luganese	Muzzano	Old town + residential	Control	Control	Release SIT
12	Luganese	Muzzano e Agno	Camping	Control	Control	Release SIT
13	Bellinzonese	Bellinzona (Camorino)	Residential	Control	Control	Release SIT
14	Bellinzonese	Bellinzona (Giubiasco)	Urban / Residential	Control	Release SIT	Release SIT
15	Bellinzonese	Bellinzona	Government and surroundings	Release SIT	Release SIT	Control
16	Locarnese	Tenero-Contra e Minusio	Camping	Control	Control	Release SIT
17	Locarnese	Locarno (verso Lido)	Urban with buildings	Control	Control	Release SIT
18	Locarnese	Locarno (nord ovest)	Urban with buildings	Control	Release SIT	Release SIT
19	Locarnese	Ascona	Residential	Control	Release SIT	Release SIT
20	Locarnese	Ascona	Old town + residential	Release SIT	Release SIT	Control
21	Locarnese	Losone	Hotel and surroundings	Release SIT	Release SIT	Control

Tabella 1. Calendario del SIT e comuni interessati. Nota bene: Qualora si dovesse spostare l'inizio dell'esperimento negli anni, lo schema rimarrebbe comunque il medesimo.

3.3 Interventi nei siti di rilascio sperimentale prima, durante e dopo il rilascio

Durante la sperimentazione, verrà condotta una regolare campagna di controllo delle zanzare tramite trattamenti larvicidi e il coinvolgimento della comunità in tutti i siti. Tuttavia, i trattamenti adulticidi verranno effettuati solo in caso di rilevamento di casi di dengue, Zika o chikungunya e saranno applicati in modo mirato (peri-focale).

La densità della popolazione locale di zanzare selvatiche sarà monitorata regolarmente attraverso ovitrappe standard, gestite ogni due settimane. Saranno inoltre condotte osservazioni sul tasso di fertilità/sterilità delle uova, applicando un protocollo di schiusa validato.

Particolare attenzione sarà posta nell'identificare le uova di *Aedes* raccolte a livello di specie, per evitare errori di interpretazione dei dati e per evidenziare eventuali effetti della Tecnica dell'Insetto Sterile (SIT) su specie non bersaglio che coesistono con *Ae. albopictus*, come *Ae. japonicus* e *Ae. koreicus*.

Il tasso di sterilità indotta e l'impatto sulla densità della popolazione locale di zanzare saranno misurati confrontando i dati con quelli di aree di controllo simili nelle vicinanze. Saranno inoltre utilizzati dati entomologici storici disponibili in queste zone come riferimento comparativo.

Verrà sviluppato anche un modello di valutazione del rischio per stimare la soglia di contaminazione delle femmine in diversi contesti, al fine di supportare i programmi SIT.

Valutazione dell'efficacia della tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus* (zanzara tigre asiatica) in diversi ambienti urbani come misura di controllo integrato nell'ambito del programma Join TDR OMS/IAEA.

In aggiunta, l'area sarà monitorata due volte al mese da maggio a ottobre, utilizzando trappole per adulti lungo un transect dal punto centrale di rilascio fino a 500 m (Figura 2), per determinare la densità e il sesso delle zanzare catturate.

In alcuni siti, le femmine raccolte sul campo verranno anche dissezionate, per valutare se il numero di cicli gonotrofici (ovodeposizione dopo il pasto di sangue) nelle zanzare selvatiche sia ridotto grazie all'effetto SIT.

Tutti i comuni selezionati per questo studio sono stati informati del progetto e hanno confermato, tramite delibere municipali, la loro disponibilità a ospitare i rilasci sperimentali nei loro territori.

3.4 Processi di inattivazione degli organismi dopo il completamento del rilascio sperimentale

La Tecnica dell'Insetto Sterile (SIT) è una strategia di controllo genetico auto-limitante, basata sul rilascio continuo di maschi sterili per indurre sterilità nella popolazione selvatica.

I maschi sterili rilasciati nel campo sopravvivranno meno di una settimana, garantendo che non ci sia persistenza della popolazione sterile dopo la conclusione del programma.

4 Siti del rilascio sperimentale

Lo studio verrà condotto in 21 siti, distribuiti nei quattro distretti del Canton Ticino (Mendrisio, Lugano, Bellinzona e Locarno), individuati sulla base delle più alte densità di *Ae. albopictus* (vedi Tabella 1 e Grafico 1).

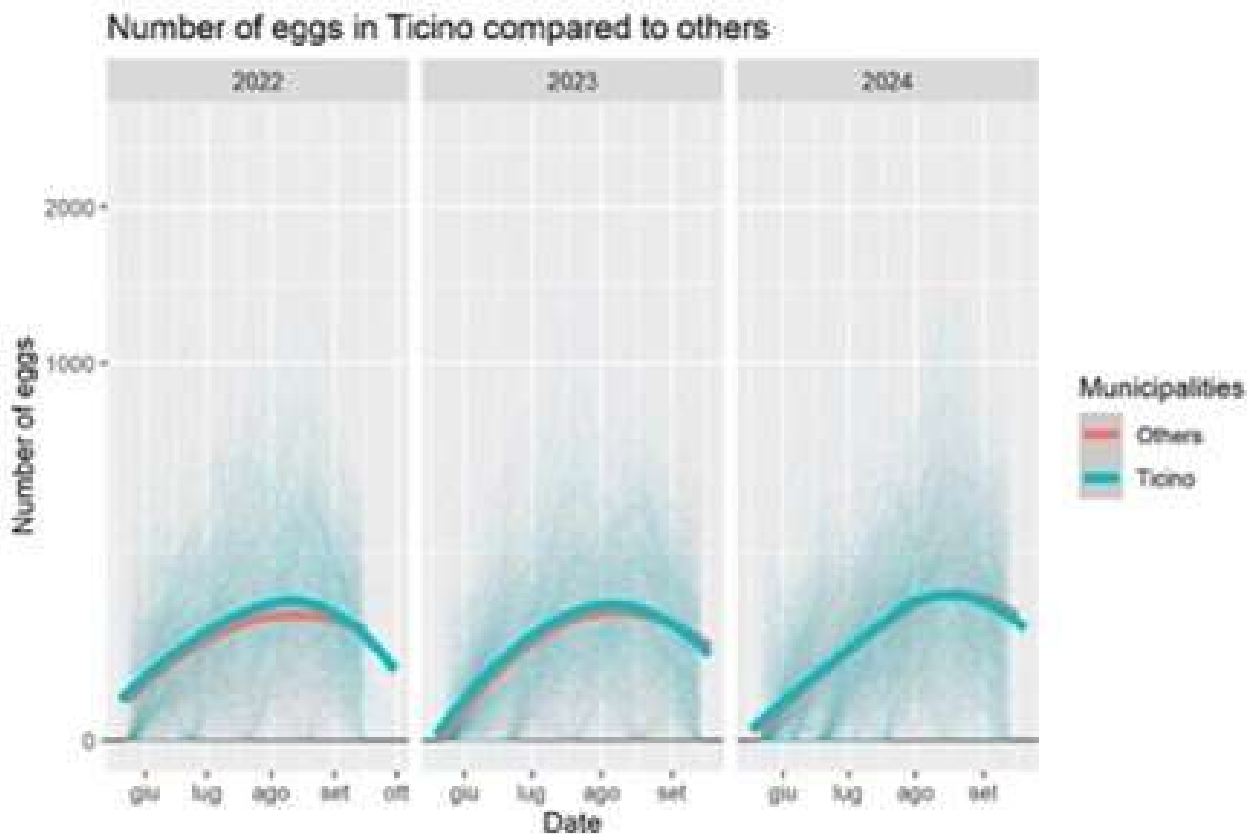


Grafico 1. Densità delle uova di *Aedes albopictus* negli anni 2022, 2023 e 2024

La linea rossa "altri" rappresenta la densità media delle uova nei seguenti comuni, che sono gli stessi selezionati per le prove SIT: Chiasso, Balerna, Coldrerio, Castel San Pietro, Mendrisio, Riva San Vitale, Melide, Paradiso, Lugano, Muzzano, Agno, Bellinzona, Tenero-Contra, Locarno, Ascona e Losone. La linea blu "Ticino" rappresenta la densità media delle uova provenienti da tutte le ovitrappole installate in più di 85 comuni coinvolti nel sistema cantonale di sorveglianza per *Aedes albopictus*.

Le densità delle uova di zanzara tigre rilevate negli ultimi anni nei siti selezionati (indicati come "altri" nel grafico) sono in linea con quelle rilevate a livello cantonale in Ticino.

I siti coprono diversi tipi di habitat tipicamente associati all'infestazione da *Ae. albopictus* in Ticino, come: centro urbano, centro di un villaggio, area residenziale, campeggio, hotel e dintorni. Ogni sito avrà un'area centrale di circa 12 ettari (Figura 1). L'area centrale è rappresentata come un cerchio con un raggio di 200 m, basato sulla massima distanza percorsa autonomamente da *Ae. albopictus*. La misura di 100-200 m di spostamento autonomo della zanzara tigre è quella adottata dai sistemi europei (Italia, Francia, Spagna e Svizzera) per gli interventi adulticidi in caso di introduzione di arbovirus. Le dimensioni dell'area sono state progettate per minimizzare l'ingresso naturale delle zanzare dall'esterno fino al centro dell'esperimento. Nei siti trattati con SIT (Figura 2, cerchio rosso), i maschi sterili verranno rilasciati due volte a settimana su tutta l'area tramite 18 punti di rilascio distribuiti uniformemente (punti rossi nel cerchio rosso). La densità e la fertilità delle uova verranno valutate sia nei siti SIT che nei siti di controllo ogni due settimane, mediante ovitrappole (1 ovitrappola per ettaro; punti blu). La densità degli adulti e il rapporto tra i sessi verranno monitorati

con la stessa frequenza, tramite trappole per adulti (punti verdi) distribuite lungo un transetto. L'effetto bordo della tecnica SIT verrà valutato raccogliendo dati su uova e adulti in un'area di confine selezionata casualmente (settore verde) di 12 ettari (che si estende per circa 300 m dal bordo dell'area centrale).

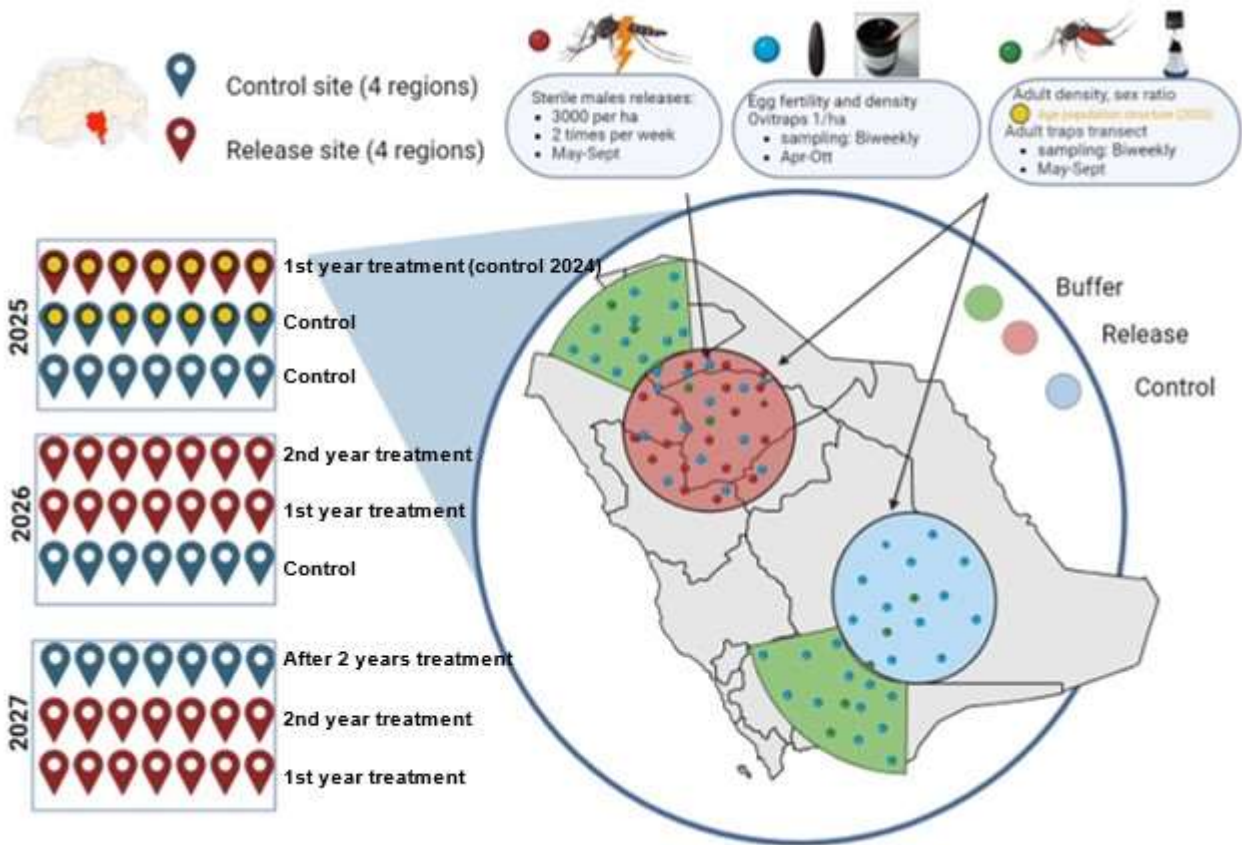


Figura 2. Disegno sperimentale. Immagine creata con BioRender.com.

4.1 Situazione geografica, dimensioni del sito di rilascio sperimentale e descrizione dell'ambiente circostante



Figura 3. Esempio di sito: Coldrerio. Il cerchio centrale con un raggio di 200 metri rappresenta l'area di rilascio dei maschi sterili. L'anello esterno tra i 200 e i 500 metri dal punto centrale definisce l'area di controllo dove i dati saranno raccolti in una frazione randomizzata, come indicato dall'ombreggiatura rossa in questo caso.

Una descrizione generale delle aree scelte, centro città, nucleo del paese, area residenziale, campeggio, hotel e dintorni, è elencata nella Tabella 1 e la Figura 3 mostra l'immagine satellitare di

una delle aree scelte come esempio. Il seguente link mostra una vista completa delle aree preselezionate:



Tutti i comuni selezionati in questo studio sono stati informati del progetto e hanno confermato, attraverso delibere comunali, di volere che questi rilasci vengano effettuati nei loro territori (vedi allegato 6).

Climatic, geological and pedological characteristics of the site of the experimental release and its nearby surroundings

Le caratteristiche geologiche e del suolo non sono rilevanti per questi rilasci, mentre lo sono le caratteristiche climatiche (grafico 2). Queste condizioni climatiche sono favorevoli alla sopravvivenza degli adulti di zanzara tigre.

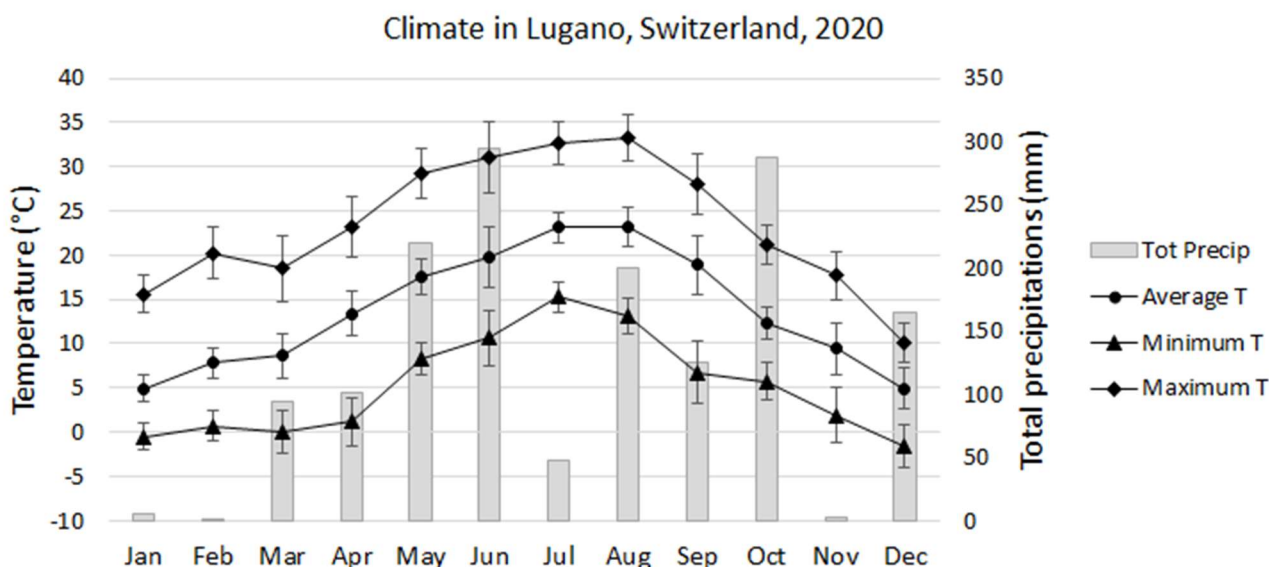


Grafico 2. Temperature e precipitazioni nella regione di Lugano nel 2020

Valutazione dell'efficacia della tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus* (zanzara tigre asiatica) in diversi ambienti urbani come misura di controllo integrato nell'ambito del programma Join TDR OMS/IAEA.

Per il rilascio di maschi sterili, sono stati scelti specificamente comuni sia nel nord che nel sud del Ticino per valutare se i fattori climatici influenzano l'efficacia della tecnica del maschio sterile (SIT). La zanzara tigre in Europa, e in particolare nel Canton Ticino, è confinata nelle aree urbane perché solo in queste aree trova siti di ovideposizione che ne consentono la riproduzione (es. tombini, sottovasi, ecc.). Infatti, a meno che non siano presenti contenitori artificiali nelle foreste, come rifiuti abbandonati, la vegetazione locale (es. cavità negli alberi) non riesce a trattenere abbastanza acqua a causa della sua struttura e della frequenza delle precipitazioni per sostenere lo sviluppo delle zanzare. In questo senso, il settore di Ecologia dei Vettori dell'IM ha già condotto numerosi studi, alcuni dei quali sono in fase di pubblicazione, in cui sono stati confrontati anche i comportamenti di deposizione delle uova e di puntura delle specie invasive *Aedes albopictus* e *Aedes japonicus*. Da questi studi emerge chiaramente che, mentre entrambe le specie depongono le uova nelle aree urbane, dove trovano siti di ovideposizione, hanno un comportamento diametralmente opposto per quanto riguarda la loro vita adulta, ovvero la puntura e il riposo: *Ae. albopictus* è attiva nelle aree urbane, mentre *Ae. japonicus* è attiva nella foresta o ai suoi margini. Per questo motivo, i siti vicini alle aree naturali non rappresentano un problema. Il fatto che per caso alcune zanzare possano entrare in un'auto è irrilevante per questo tipo di esperimento, poiché i maschi, non essendo pungenti, non tendono a seguire gli esseri umani e quindi a entrare nelle auto, mentre alcune femmine (comunque rare nell'esperimento), non essendo fertili, non saranno in grado di diffondere l'esperimento altrove e moriranno di morte naturale entro una settimana.

I maschi (sterili e selvatici) così come le femmine (in misura maggiore) entrano nei veicoli quando le persone salgono in macchina, e non vi è trasporto passivo quando le auto sono in movimento. Inoltre, le autostrade sono state proposte come potenziali barriere alla dispersione di *Aedes aegypti*, e alcuni studi hanno riportato un effetto inibitorio delle autostrade sul comportamento di dispersione di questa specie (Hemme et al. 2010).

4.3 Flora e fauna, compresi colture, bestiame e specie migratorie

I rilasci verranno effettuati esclusivamente in aree urbane o antropizzate (città, zone residenziali, campeggi, hotel), pertanto non vi sono particolari specifiche per la protezione della flora e fauna locale.

4.4 Descrizione dell'ecosistema

Come indicato al punto 4.3, i rilasci avverranno esclusivamente in aree urbane o antropizzate; quindi, non vi sono specifiche particolari per la protezione di ecosistemi specifici.

5 Possibili effetti

5.1 Effetti sugli esseri umani e sugli animali, in particolare rischi per la salute (es. effetti allergenici, patogeni o tossici, irritazioni cutanee, trasmissione di malattie)

I maschi sterili di zanzara tigre provengono da popolazioni del Canton Ticino, non sono stati geneticamente modificati e non pungono. Non si prevedono effetti dovuti al loro rilascio. Una piccola percentuale (meno dell'1%) di femmine potrebbe essere accidentalmente rilasciata, sebbene sterili. In questo caso, le femmine punterebbero, quindi durante i primi rilasci primaverili potrebbe verificarsi un minimo aumento del fastidio per la popolazione residente. Durante la stagione, tuttavia, il numero

totale di zanzare locali dovrebbe diminuire drasticamente grazie all'esperimento, riducendo quindi anche il fastidio causato dalle punture, che in Ticino diventa normalmente percepibile dalla fine di luglio. Le zanzare femmine possono anche essere potenziali vettori di malattie trasmesse da zanzare. Tuttavia, queste malattie non sono presenti sul territorio ed esiste un sistema di allerta con l'Ufficio del Medico Cantonale (Fouque et al. 2020). Inoltre, la capacità vettoriale per i virus chikungunya e dengue nelle zanzare *Ae. albopictus* irradiate (40 Gy) non è risultata diversa dai valori registrati nelle popolazioni selvatiche (Balestrino et al. 2021, in revisione). L'irradiazione può anche alterare la frequenza del pasto di sangue nelle specie di *Aedes*, riducendone potenzialmente la capacità vettoriale (Cunningham et al. 2020, Aldridge et al. 2020). Se dovesse verificarsi un caso di una persona affetta da una delle malattie trasmissibili, l'esperimento verrebbe sospeso e verrebbero applicati i trattamenti previsti dal piano d'azione per il contenimento delle malattie trasmesse dalla zanzara tigre. Finora, anche grazie a questo piano d'azione, non si sono mai verificati casi di trasmissione locale di malattie nel Canton Ticino. L'eliminazione o la soppressione di una specie esotica invasiva potrebbe essere considerata desiderabile. Inoltre, in Ticino non vi sono animali che si nutrono esclusivamente di zanzare allo stadio adulto o immaturo. In ogni caso, la specificità della tecnica SIT garantisce che solo una singola specie verrebbe rimossa o soppressa; l'approccio SIT è mirato e ambientalmente sostenibile e può comunque essere reversibile prima dell'eradicazione globale della specie bersaglio (Alphey et al. 2010).

5.2 Effetti sull'ambiente e sulla biodiversità

Come descritto nella Sezione 2.8.2, la zanzara tigre nel Canton Ticino non fa parte di alcuna catena alimentare particolare. La sua riproduzione in piccoli focolai urbani crea una competizione con un'altra specie di zanzara locale, *Culex pipiens*, che tuttavia si riproduce anch'essa in aree urbane con contenitori artificiali simili. Una riduzione della zanzara tigre durante l'esperimento potrebbe favorire *Culex pipiens*, ma questa specie è comunque soggetta alle azioni di controllo della fase acquatica della zanzara tigre (trattamenti larvicidi e rimozione dei focolai), misure integrate che fanno parte del sistema di sorveglianza contro la zanzara tigre in Ticino e che continueranno regolarmente. Inoltre, i siti di riproduzione di *Culex pipiens* sono più facili da identificare e quindi da controllare rispetto a quelli di *Ae. albopictus*, poiché quest'ultima è in grado di svilupparsi anche in quantità d'acqua molto inferiori. Per gli insetti, i dati filogenetici mostrano che il trasferimento genico orizzontale (trasferimento diverso dall'incrocio) è estremamente raro, anche su una scala temporale di milioni di anni, tra specie strettamente imparentate. Per il metodo SIT, per un predatore o uno spazzino che si nutre della zanzara, o per un mammifero punto da essa, le conseguenze sarebbero esattamente le stesse di quelle causate da una normale zanzara selvatica (Alphey et al. 2010).

5.2.1 Effetti sui processi ambientali o sulle funzioni importanti del suolo

Nessun effetto da segnalare.

5.2.2 Potenziale di insediamento e diffusione nel sito di rilascio sperimentale

Le zanzare sono sterili; quindi, non c'è possibilità che si insedino.

5.2.3 Ruolo ecologico previsto nel sito di rilascio sperimentale, identificazione e descrizione degli organismi bersaglio, conseguenze degli effetti sugli organismi bersaglio

Lo scopo dell'esperimento è ridurre la popolazione locale di zanzare tigre durante la stagione. Ciò è stato confermato dall'esperimento condotto a Morcote, che ha registrato una riduzione delle femmine del 67%.

5.2.4 Nemici naturali degli organismi bersaglio nel sito di rilascio sperimentale che potrebbero essere indirettamente influenzati

Non esistono nemici naturali rilevanti per la zanzara tigre nel Canton Ticino (vedi sezioni 2.8.2 e 5.2).

5.2.5 Possibili effetti diretti e indiretti sugli organismi non bersaglio

I maschi sterili di *Aedes albopictus* si accoppiano selettivamente con femmine della stessa specie; quindi, non ci sono organismi non bersaglio coinvolti.

5.2.6 Possibile competizione con o sostituzione di specie indigene

Vedi sezione 5.2: non esiste alcun rischio di sostituzione di specie autoctone.

5.2.7 Potenziale di ibridazione con ceppi o biotipi indigeni

Essendo sterili, i maschi non producono prole. I maschi sterili hanno una fertilità residua inferiore all'1%. La prole che potrebbe eventualmente essere prodotta presenta una fitness fortemente ridotta (vedi sezione 2.8.3).

5.2.8 Effetti sulle piante

Le zanzare si nutrono delle sostanze zuccherine delle piante, ma non sono considerate parassiti delle piante. Pertanto, nessun effetto.

5.2.9 Altri possibili effetti significativi

Nessuno.

6 Misure di sicurezza

6.1 Precauzioni

6.1.1 Metodi e procedure per prevenire o minimizzare la diffusione degli organismi al di fuori del sito di rilascio sperimentale

Gli esperimenti di marcatura-rilascio-ricattura condotti a Morcote dimostrano che i maschi non volano tipicamente per più di 100 metri in media; quindi, la loro stessa natura impedisce la loro presenza in aree lontane dall'esperimento. La zanzara rilasciata nelle aree target può essere controllata in qualsiasi momento semplicemente interrompendo il rilascio dei maschi sterili, che sopravviveranno in campo per un tempo limitato (Bellini et al. 2010). Le aree di prova possono essere separate da una zona cuscinetto sufficiente di circa due volte la distanza stimata di

dispersione delle zanzare. Per ridurre ulteriormente la persistenza degli organismi rilasciati, si possono utilizzare barriere dense di trappole letali specifiche (Oliva et al. 2021).

La stima della dimensione della popolazione verrà effettuata in base ai metodi descritti nel paragrafo 3.1. Considerando i risultati precedenti ottenuti in diversi studi sul campo (Bellini et al. 2013; 2020), la popolazione selvatica può essere efficacemente monitorata con l'uso di ovitrappole. Sebbene la tecnica SIT si basi tipicamente sul rilascio routinario di un rapporto fisso e abbondante di maschi sterili per mantenerne la massima efficacia in campo, la dose di rilascio può essere modulata in base ai risultati della dinamica di popolazione misurati tramite ovitrappole.

Si prevede di installare ovitrappole e trappole per adulti per monitorare la dinamica della popolazione attorno al sito di prova.

6.1.2 Metodi e procedure per prevenire l'accesso non autorizzato al sito di rilascio sperimentale

Non sono necessarie procedure per prevenire l'accesso non autorizzato al sito di rilascio, data la natura specie-specifica del metodo.

I maschi sterili arriveranno dall'Italia, come nell'esperimento condotto a Morcote, e verranno rilasciati direttamente nel sito sperimentale. I maschi sterili saranno liberati immediatamente all'arrivo nel sito di prova senza necessità di mantenerli in condizioni di laboratorio. Come descritto nelle SOP allegate del CAA, dopo l'arrivo a destinazione, i maschi verranno immediatamente trasferiti dalle scatole di trasporto dedicate a contenitori più grandi direttamente sul campo. I maschi raffreddati si risveglieranno direttamente in campo e si disperderanno nell'area.

6.1.3 Metodi e procedure per prevenire l'ingresso di altri organismi nel sito

L'introduzione di altri organismi all'interno del sito sperimentale non può produrre alcuna contaminazione dell'organismo stesso o dell'ambiente, poiché i maschi sterili della zanzara tigre sono selettivi nell'accoppiamento con le femmine della stessa specie.

Il rilascio dei maschi sterili verrà effettuato in 21 siti (sezione 4.1.), dove saranno rilasciati a terra allo stadio adulto a diverse densità di rilascio aprendo le scatole contenenti circa 36.000 maschi sterili per scatola da punti di rilascio distribuiti omogeneamente. La distanza tra i punti di rilascio sarà compresa tra 80-100 m. In tutte le località verrà condotta un'attività di monitoraggio mediante ovitrappole posizionate con una densità di 1 per ettaro nelle aree di rilascio e 1 per ettaro nelle aree di controllo (Figura 2).

L'esperimento non sarà più condotto in un'area isolata da barriere naturali come quella di Morcote, poiché l'obiettivo è testarne l'efficacia operativa in situazioni urbane. Ridurre la zanzara tigre in un'area isolata con misure di controllo integrate (rimozione dei focolai larvali e trattamento di quelli non rimovibili casa per casa) è relativamente semplice se si opera con coerenza e precisione. In un'area isolata, senza continue introduzioni, si può persino ottenere l'eliminazione temporanea della specie. Ciò è già accaduto in diversi casi nel Canton Ticino, e il caso più eclatante in Svizzera è stato quello di Wollishofen, un quartiere di Zurigo, dove una gestione attenta ha eliminato la zanzara tigre: trovata nel 2018 e 2019, poi non più rilevata dal 2020 (Gabi Müller, rapporto Swiss Mosquito Network). La tecnica del maschio sterile, con l'aggiunta di un biocida, ha dimostrato la sua efficacia

in aree isolate come il Brando Hotel in Polinesia Francese contro *Aedes polynesiensis* (<https://www.bbc.com/news/business-48380590>).

Lo scopo di questo esperimento è testare l'efficacia in diversi tipi di aree urbane e valutare l'estensione della sua efficacia sulla superficie. Questo rappresenta la base per poter formulare raccomandazioni ai potenziali utenti finali (comuni e strutture private come hotel o campeggi) e condurre un'analisi reale costi/benefici della tecnica stessa.

6.2 Smaltimento dei rifiuti

L'esperimento proposto non prevede la produzione di rifiuti nel sito sperimentale. L'unità di produzione di massa del CAA ha già organizzato procedure di smaltimento dei rifiuti in conformità con la normativa sanitaria nazionale per i residui organici degli insetti morti e per i residui di sangue e dieta utilizzati per alimentare gli adulti nelle colonie.

6.2.1 Tipologia e quantità di rifiuti prodotti

Non applicabile. Vedi paragrafo 6.2.

6.2.2 Possibili rischi

Non applicabile. Vedi paragrafo 6.2.

6.2.3 Descrizione della procedura di smaltimento pianificata

Non applicabile. Vedi paragrafo 6.2.

6.3 Piani di emergenza

6.3.1 Metodi e procedure per il controllo degli organismi in caso di diffusione inattesa

Le zanzare rilasciate nelle aree target possono essere controllate in qualsiasi momento semplicemente interrompendo il rilascio dei maschi sterili, che sopravviveranno in campo per un tempo limitato, già valutato in meno di una settimana come dimostrato nell'esperimento di Morcote (sezione 2.7). In caso di problemi, come il rischio di trasmissione di malattie, l'esperimento verrà immediatamente sospeso e saranno applicate le misure previste dal piano d'azione cantonale, includendo l'installazione di ovitrappole nelle aree di rilascio e buffer, la riduzione intensiva delle fonti larvali e il trattamento adulticida (Fouque et al. 2020).

6.3.2 Metodi di decontaminazione delle aree colpite

Nessun trasferimento genetico dai maschi sterili ad altre specie o all'ambiente è previsto utilizzando la tecnica SIT classica. Vedi paragrafo 5.2.

6.3.3 Metodi per lo smaltimento o il trattamento di piante, animali, suolo ecc. interessati dalla diffusione degli organismi

Con il metodo SIT classico non è previsto il trasferimento di geni dai maschi sterili ad altre specie o all'ambiente. Si veda il paragrafo 5.2.

6.3.4 Piani di protezione dell'uomo e degli animali, dell'ambiente e della diversità biologica in caso di effetti indesiderati

Come descritto nel paragrafo 5.1., poiché con il rilascio di maschi sterili vengono rilasciate in parte anche alcune femmine sterili, nel caso in cui vi sia una persona affetta da una malattia trasmissibile dalla zanzara tigre, l'esperimento verrebbe sospeso e si procederebbe con le misure di controllo previste a livello cantonale per evitare casi di trasmissione locale di malattie.

7 Determinazione e valutazione del rischio

7.1 Scopo e procedura

¹ *Lo scopo della determinazione del rischio è quello di determinare e valutare le conseguenze del caso reale di manipolazione di organismi nell'ambiente, per:*

- a. *gli esseri umani, gli animali o l'ambiente, la diversità biologica e il suo uso sostenibile;*
- b. *nel caso di organismi geneticamente modificati, la conservazione a lungo termine della produzione che non utilizza organismi geneticamente modificati.*

² *La valutazione del rischio deve valutare la sua giustificabilità.*

³ *La determinazione del rischio deve essere effettuata secondo criteri e metodi scientifici e deve basarsi su dati scientifici e tecnici disponibili, pubblicazioni scientifiche, risultati di calcoli e analisi dettagliate. La valutazione dei rischi per la loro giustificabilità deve essere presentata in modo fondato e comprensibile.*

I rischi legati agli obiettivi di protezione durante una campagna di rilascio di SIT sono stati identificati in tre grandi aree legate alla salute e all'ambiente: salute umana, disturbo per le persone e biodiversità.

L'obiettivo della salute umana potrebbe essere ulteriormente suddiviso in rischi più specifici, tra cui:

- Lavoratori di impianti di produzione/rilascio di SIT colpiti da problemi di salute come reazioni allergiche o irradiazioni nell'ambiente di produzione o durante le procedure di laboratorio, trasporto e rilascio;
- Mutazioni nei maschi irradiati che modificano la capacità vettoriale e il comportamento delle zanzare vettoriali;
- Sostituzione della nicchia con una specie vettoriale più competente;
- Compiacenza che porta a ridurre gli sforzi di controllo complementare dei vettori.

L'obiettivo di disturbo è legato a preoccupazioni più specifiche sul rischio di disturbo da puntura da parte di qualsiasi zanzara femmina rilasciata tramite SIT e sul disturbo percepito da maschi sterili non pungenti. L'obiettivo della biodiversità è legato a preoccupazioni più specifiche sul rischio di sostituzione della nicchia che influisce sull'equilibrio ecologico e sulla perdita di tutte o parte delle specie vettoriali endemiche o naturalizzate con un ruolo ecologico (OMS, IAEA 2019). In questo caso, tuttavia, riteniamo che, essendo *Ae. albopictus* una specie esotica invasiva, la sua riduzione non danneggerebbe una nicchia ecologica di interesse, ma anzi tenderebbe a ripristinare una situazione ecologica simile a quella precedente all'arrivo della zanzara tigre. È anche vero che sul territorio sono presenti altre specie invasive, ovvero *Ae. japonicus* e *Ae. koreicus*, che sfruttano siti di riproduzione simili a quelli della zanzara tigre, per cui la riduzione della zanzara tigre potrebbe

favorire queste specie. Tuttavia, va sottolineato che queste specie non presentano particolari rischi vettoriali di trasmissione di malattie o di disturbo pubblico.

7.2 Identificazione dei pericoli e determinazione del rischio

7.2.1 Identificazione dei pericoli

¹ Deve essere determinato il potenziale degli organismi, quando vengono manipolati nell'ambiente, di compromettere i due obiettivi di protezione di cui al numero 1, paragrafo 1. In particolare, devono essere presi in considerazione i seguenti elementi:

- a. le proprietà degli organismi
- b. l'esperienza nell'uso degli organismi
- c. le modifiche genetiche nel caso di organismi geneticamente modificati;
- d. le interazioni con l'ambiente;
- e. i percorsi abituali di trasporto e lavorazione di questi organismi.

² Tale determinazione si basa su dettagli in conformità con gli artt. 19, 20 o 21, o 28, 29 o 30.

Grazie alla lunga storia del SIT come strumento di controllo degli insetti nocivi, molti aspetti di questa tecnologia sono relativamente noti. Si tratta di uno strumento di controllo dei parassiti specifico per l'intera area, i cui rischi potenziali per le specie non bersaglio e gli ecosistemi sono in genere significativamente inferiori a quelli associati a tecnologie meno mirate, come le applicazioni aeree di adulticidi convenzionali ad ampio spettro.

I maschi sterili da rilasciare nelle aree di studio saranno allevati e sterilizzati presso il CAA in Italia, fuori dalla Svizzera, in strutture specializzate con adeguati standard di protezione del personale durante le procedure di allevamento e sterilizzazione degli insetti (secondo la SOP allegata). I maschi sterili saranno trasportati, allo stadio di adulti, in apposite scatole a doppio contenimento di sicurezza (secondo le procedure internazionali per il trasporto di materiale biologico UN 3373 categoria B) e refrigerati per preservarne la qualità durante il trasporto.

I maschi sterili prodotti possono contenere una piccola percentuale di femmine residue (<1%), anch'esse sterili, che verranno rilasciate in campo insieme ai maschi. Anche se queste femmine mantengono la loro attività trofica, sono completamente sterili alla dose di radiazioni ricevuta e gli studi scientifici sulle specie di *Aedes* mostrano una minore incidenza di alimentazione con sangue e nessuna produzione di prole (Bond et al. 2019, Aldridge et al. 2020). La loro capacità vettoriale nei confronti di importanti virus introdotti accidentalmente nelle aree dell'Europa meridionale (chikungunya e dengue) è ancora presente, tuttavia nelle aree di studio selezionate la specie invasiva *Ae. albopictus* non è mai stata riconosciuta come vettore per la trasmissione di patogeni indigeni o introdotti nella popolazione (cfr. sezione 5.1). Dai dati preliminari dell'esperimento di Morcote, che sarà condotto in modo più esteso con questo nuovo esperimento, sembra che la tecnica SIT induca anche una riduzione dell'età delle femmine oltre alla loro diminuzione numerica, contribuendo così alla diminuzione della trasmissione di importanti patogeni con i virus dengue e chikungunya.

La tecnica dell'insetto sterile rappresenta uno strumento da utilizzare in progetti di lotta integrata su larga scala senza sospendere le normali attività di controllo e sorveglianza già attivate contro questo insetto nelle aree di studio individuate.

I maschi sterili mantengono caratteristiche comportamentali identiche ai maschi fertili conspecifici, in modo da potersi disperdere, sopravvivere e competere con successo con la popolazione selvatica nelle aree di studio selezionate. Come i maschi selvatici, anche i maschi sterili formano sciami di accoppiamento in prossimità di aree verdi e di ospiti femminili in attesa dell'arrivo di femmine conspecifiche. Questo comportamento potrebbe causare un fastidio temporaneo alla popolazione, ma il rilascio di maschi sterili effettuato in molti Paesi, in passato, non ha portato ad alcuna criticità legata al comportamento dei maschi rilasciati. Questo rischio può essere gestito attraverso un'adeguata comunicazione alle popolazioni locali. Nell'esperimento condotto nel comune di Morcote, non ci sono state lamentele di alcun tipo sul comportamento dei maschi o un rifiuto della tecnica utilizzata. Al contrario, le persone hanno espresso una sensazione di riduzione dei morsi rispetto agli anni precedenti all'uso del SIT, e si sono dichiarate soddisfatte, così come il comune stesso, della tecnica in generale.

I maschi sterili rilasciati sono prodotti a partire da ceppi raccolti in campo nelle stesse aree sperimentali e la sterilità indotta è generata attraverso l'uso di dosi calibrate (30 o 35 Gy, rateo di dose 2-3 Gy/min) di radiazioni ionizzanti in grado di indurre mutazioni letali dominanti casuali che portano alla quasi completa sterilità degli insetti rilasciati (> 99%). La sterilità è indotta attraverso metodi classici di mutagenesi che hanno una lunga storia di applicazioni sicure in progetti SIT per molti parassiti di interesse agronomico e veterinario negli ultimi 60 anni di applicazioni in campo. I maschi radio-sterilizzati sono considerati organismi benefici per il controllo genetico biologico degli insetti nocivi (FAO 2005) e il SIT è l'unica strategia di controllo genetico pienamente approvata e applicata in campo con enormi benefici socio-economici e ambientali diretti. La Corte di giustizia dell'Unione europea (Comunicato stampa n. 111/18, Lussemburgo, 25 luglio 2018; sentenza nella causa C-528/16) ha dichiarato che gli organismi ottenuti con tecniche di mutagenesi che sono stati convenzionalmente utilizzati in una serie di applicazioni e hanno una lunga storia di sicurezza sono esenti dagli obblighi stabiliti dalla direttiva sugli OGM sull'emissione nell'ambiente di organismi geneticamente modificati (direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 marzo 2001; direttiva 90/220/CEE del Consiglio - GU L 106, pag. 1) (cfr. sezione 2.8.3). Inoltre, in un nostro recente studio (Ravasi et al. 2024) "La presenza di numerosi SNP suggerisce che l'irradiazione dei maschi di zanzara induce variazioni genetiche più ampie rispetto alle sole mutazioni letali dominanti. I geni mutati non sembrano influenzare i processi biologici, tranne in un caso. Solo in quattro casi abbiamo riscontrato processi biologici significativamente influenzati da geni mutati che molto probabilmente sono stati trasmessi alla progenie maschile. I nostri risultati suggeriscono che le mutazioni casuali indotte da una dose sub-sterilizzante di raggi gamma nelle pupe maschili di *Ae. albopictus* e trasmesse alla progenie maschile non influenzano i processi biologici potenzialmente dannosi".

7.2.2. Determinazione del rischio

¹ Il rischio è determinato dall'entità del possibile danno agli obiettivi di protezione indicati al numero 1, paragrafo 1, e dalla probabilità che tale danno si verifichi.

² Per proteggere gli esseri umani, gli animali e l'ambiente, nonché la diversità biologica e il suo uso sostenibile, devono essere esaminati almeno i seguenti scenari di danno:

- a. *Pericolo per la salute umana causato dagli organismi o dai loro prodotti genici: devono essere indicati il tipo (allergenicità, patogenicità, tossicità, ecc.) e la gravità dei possibili effetti;*
- b. *Insedimento e diffusione degli organismi: devono essere indicate le vie di fuga dal sito di utilizzo, le condizioni di insediamento nell'ambiente, lo sviluppo della densità di popolazione, l'entità dello spostamento di altri organismi (singoli individui, intere popolazioni, intere specie) e le specie interessate (organismi coltivati o selvatici, specie in pericolo o utili);*
- c. *Trasferimento genico: devono essere indicate le vie di trasmissione del materiale genetico, i meccanismi di crossing out o ricombinazione e i possibili partner di incrocio, la fertilità della prole e i vantaggi selettivi;*
- d. *Deterioramento di altri organismi (organismi non bersaglio): devono essere indicati il tipo di effetti diretti (ad esempio attraverso prodotti genici tossici) o indiretti (ad esempio attraverso un'alterazione della coltivazione del suolo), la durata (acuta, cronica) e la gravità degli effetti;*
- e. *Pericolo per i cicli della materia: devono essere indicati il tipo di alterazione degli inquinanti e dei nutrienti nel suolo o nell'acqua e il grado di alterazione, da valutare in termini di perturbazione di importanti funzioni dell'ecosistema (fissazione dell'azoto, respirazione del suolo, ecc.);*
- f. *sviluppo di resistenza: devono essere indicati il tipo di resistenza sviluppata, le conseguenze per le strategie di controllo e gli impatti ecologici di strategie di controllo alternative.*

³ Nel caso di organismi geneticamente modificati, per proteggere le produzioni che non utilizzano organismi geneticamente modificati devono essere esaminati almeno i seguenti scenari di danno:

- a. *Contaminazione di aree di produzione attraverso il trasferimento verticale di geni: deve essere indicato il trasferimento di geni attraverso la ricombinazione sessuale (ad esempio, i meccanismi di crossing-out, le distanze di volo del polline, i possibili partner di incrocio all'interno delle specie coltivate o utilizzate, la fertilità della prole e i loro vantaggi selettivi);*
- b. *Contaminazione di prodotti privi di organismi geneticamente modificati attraverso l'uso di attrezzature: devono essere indicati l'uso di attrezzature per il rilascio e la lavorazione degli organismi (ad esempio, macchine per la semina o la raccolta), l'uso abituale (ad esempio, macchine proprie o prese in prestito da cooperative) e le procedure di pulizia;*
- c. *Contaminazione di prodotti privi di organismi geneticamente modificati attraverso perdite non intenzionali: devono essere indicate le possibili vie di fuga (ad esempio, seconda crescita, deriva di prodotti fitosanitari, perdite durante il trasporto), nonché l'insediamento e la diffusione degli organismi (ad esempio, condizioni di insediamento nell'ambiente, sviluppo della densità di popolazione);*

- d. *Contaminazione di prodotti privi di organismi geneticamente modificati durante la lavorazione: devono essere indicati i percorsi di lavorazione abituali, le fasi e i luoghi in cui potrebbero verificarsi miscele e ambiguità.*

⁴ *La probabilità che si verifichino danni durante la manipolazione nell'ambiente deve essere determinata per tutti gli scenari di danno.*

⁵ *Le informazioni devono essere quantificate per quanto possibile.*

Il rilascio periodico di maschi sterili non pungenti a dosi diverse non contribuisce in alcun modo all'aumento del rischio sanitario legato alla possibile circolazione di agenti patogeni o all'aumento dell'attività trofica di questi organismi. Il rischio associato al rilascio accidentale di femmine sterili mordaci è mitigato dalla progressiva e concomitante riduzione della densità di popolazione prodotta dall'aumento della sterilità indotta nella popolazione selvatica. Inoltre, l'eventuale rilascio e distribuzione accidentale sul campo di maschi e femmine fertili è minima, poiché gli impianti di produzione di massa, sessaggio e sterilizzazione sono situati lontano dalle aree di rilascio e tutti i lotti di maschi sterili inviati in Svizzera seguono procedure di controllo della qualità volte a determinare la percentuale di femmine contaminanti presenti, il numero e la sterilità dei lotti di maschi prodotti. Qualora si verificasse in natura un rilascio accidentale di insetti maschi o femmine fertili, non si genererebbe alcun rischio per l'ambiente, poiché il patrimonio genetico di questi insetti è identico a quello degli individui già presenti nelle aree di rilascio. Inoltre, il rilascio di insetti fertili o sterili non influirebbe sull'integrità genetica di altre specie non bersaglio, ma altererebbe semplicemente il tasso di puntura di *Ae. albopictus* limitatamente al periodo di presenza sul campo. Secondo il Morcote l'aspettativa di vita media era di 2,18 giorni (sezione 2.7). Tuttavia, va sottolineato che la tecnica SIT è una metodologia autolimitante in cui gli insetti rilasciati inducono un certo grado di sterilità e poi scompaiono dall'ambiente senza lasciare un impatto genetico permanente sulla specie bersaglio e senza alcun effetto sulle specie non bersaglio.

Come indicato in precedenza, la tecnica SIT vanta un lungo record di assenza di fenomeni di resistenza. L'unico caso ipotetico di resistenza riguarda la selezione accidentale in laboratorio di ceppi altamente adattati alle condizioni di allevamento artificiale e incapaci, una volta in campo, di competere efficacemente per l'accoppiamento con le femmine selvatiche. Tuttavia, è possibile adottare strategie di gestione della resistenza nel sito di produzione per invertire con successo questa condizione avversa (McInnis 1996, Whitten e Mahon 2005, Alphey et al. 2010).

7.3 Valutazione e gestione del rischio

7.3.1 Valutazione delle misure di sicurezza

¹ *Sulla base della determinazione del rischio, occorre determinare le possibili misure di sicurezza e valutarne l'efficacia in termini di riduzione del rischio.*

² *Se sono disponibili più misure di sicurezza equivalenti, la scelta della misura proposta deve essere giustificata.*

I maschi sterili ricevuti in Svizzera in appositi contenitori isolati saranno rilasciati dagli operatori SUPSI in campo in stazioni di rilascio adeguatamente distribuite nelle aree di sperimentazione. Gli operatori durante la manipolazione degli insetti devono adottare un abbigliamento adeguato per

ridurre al minimo i possibili morsi delle femmine rilasciate accidentalmente. Gli operatori in campo devono comunque adottare gli stessi dispositivi di protezione individuale anche durante le procedure standard di sorveglianza e monitoraggio di questa specie nelle aree di rilascio e nelle aree di controllo non trattate.

I maschi sterili allevati nel sito di produzione (CAA, Italia) a partire da materiale raccolto in campo in Svizzera saranno sottoposti a procedure di controllo di qualità volte a limitare la presenza di femmine a una soglia inferiore all'1%. La sterilizzazione degli insetti irradiati con radiazioni ionizzanti sarà effettuata da personale specializzato presso centri sanitari nazionali in grado di garantire le procedure di sicurezza e la corretta dosimetria di irraggiamento degli insetti trattati. Per mantenere un corretto dimorfismo dei ceppi allevati e per limitare i fenomeni di selezione alle condizioni artificiali, il ceppo può essere periodicamente incrociato con materiale selvatico proveniente dal campo. Il mantenimento della variabilità genetica garantisce un migliore sessaggio dei maschi e favorisce il mantenimento della competitività in campo (McInnis 1996, Whitten e Mahon 2005). Gli insetti rilasciati sopravvivono in campo meno di una settimana e possono essere contenuti attraverso le normali strategie di controllo dei vettori insieme a trappole letali di massa o ovitrappole. Inoltre, gli esperimenti di marcatura-rilascio-ricattura condotti a Morcote dimostrano che i maschi non volano in media per più di 100 metri, quindi la loro natura impedisce la loro presenza in aree lontane dall'esperimento (sezione 2.7). In casi estremi, le zone barriera possono essere prodotte da una combinazione di riduzione intensiva delle fonti, larvicidi e adulticidi (Oliva et al. 2021; Fouque et al. 2020).

I maschi rilasciati saranno regolarmente monitorati sul campo per misurarne la densità, la fertilità, la competitività, la dispersione e la sopravvivenza. Sebbene non esista un metodo efficace per distinguere i maschi sterili da quelli selvatici, l'impatto dei maschi sterili rilasciati può essere misurato misurando la fertilità e la densità delle uova sul campo. Due volte al mese effettueremo anche un monitoraggio giornaliero utilizzando le trappole sentinella BG dove vengono effettuati i rilasci e in un'area di controllo non trattata, per confrontare il rapporto M/F nei due ambienti e dedurre il rapporto S/W e il tasso di sopravvivenza giornaliera dei maschi sterili (si veda anche la sezione 3.1. "Stima della densità dei maschi selvatici"). "Stima della densità dei maschi selvatici e sterili" della domanda).

Il monitoraggio sarà utilizzato anche per valutare se il declino della popolazione bersaglio porterà ad un aumento della presenza e della densità di diverse specie di zanzare autoctone e invasive nelle aree di studio.

Il SIT si inserisce molto bene in un programma di eliminazione o eradicazione di una malattia trasmessa da vettori, poiché è uno dei pochi strumenti di controllo dei vettori con una comprovata esperienza nell'eliminazione dei parassiti su vaste aree, anche su scala continentale. L'eliminazione o la soppressione di un vettore obbligato elimina o contiene la trasmissione sotto la soglia di rischio sanitario (Alphey et al. 2010).

7.3.2 Valutazione del rischio

¹ Il rischio della manipolazione prevista nell'ambiente deve essere esaminato per verificarne la giustificabilità, sulla base del tipo, della gravità e della probabilità dei possibili danni e tenendo conto delle misure di sicurezza previste.

² *Devono essere presentate le ragioni per cui il rischio determinato al numero 2 è giustificabile per gli obiettivi di protezione indicati nella sezione 1, paragrafo 1.*

³ *Nel valutare la giustificabilità, si deve tenere conto di quanto segue:*

- a. *il principio di precauzione in conformità con l'articolo 2 GTA e l'articolo 1, paragrafo 2 EPA;*
- b. *l'efficacia delle misure di sicurezza determinate in base al punto 3.1;*
- c. *altri rischi ai sensi dell'articolo 6, paragrafo 4, dell'ATR e dell'articolo 8 dell'APE;*
- d. *l'eventuale reversibilità del danno;*
- e. *che quanto maggiore è l'entità del possibile danno, tanto minore deve essere la probabilità che esso si verifichi.*

Nessun altro metodo di controllo delle zanzare attualmente disponibile è in grado di ottenere un controllo efficace e sostenibile delle specie vettoriali di zanzare *Aedes*. Il metodo SIT proposto non presenta rischi per la salute umana né per l'ambiente, mentre i metodi attuali, basati principalmente sugli insetticidi, hanno impatti rilevanti sull'ambiente e sulla salute pubblica. La resistenza agli insetticidi sta aumentando, mentre non è prevista alcuna resistenza nel SIT. Questa tecnica è ecologica, specificamente mirata, spazialmente limitata e non persistente, caratteristiche che possono aiutare a proteggere la salute pubblica, la fauna non bersaglio e l'ambiente (Oliva et al. 2021). La matrice dei rischi associata illustra la probabilità e le conseguenze dei rischi descritti nel testo. A ogni danno potenziale viene assegnato un valore per la probabilità e la conseguenza. La tabella che segue utilizza definizioni soggettive per i punteggi di probabilità e conseguenza in base alla situazione ecologica ed epidemiologica relativa alla presenza di vettori di zanzare invasive antropofili nell'area di studio (Tabella 1).

Come descritto nella Tabella 1 e nel presente documento, i risultati illustrati relativi agli obiettivi di protezione possono informare il processo decisionale dei regolatori sull'elevata accettabilità dei rischi descritti e sui loro rischi improbabili o moderati con bassi livelli di conseguenze. Mentre i rischi per la salute e l'ambiente di questa tecnica sono estremamente rari e non hanno un impatto permanente sulla popolazione e sugli ecosistemi coinvolti, il rischio legato alle attività di comunicazione è considerato uno dei rischi più critici per l'accettabilità del programma SIT per la popolazione umana. Lo sviluppo del piano di comunicazione del rischio sarà attuato al fine di mantenere una continua informazione e partecipazione del pubblico e dei principali stakeholder sulle attività e sui risultati raggiunti in questo progetto. L'istituzione di un forum consultivo con le parti interessate a livello locale sarà un'utile strategia di gestione delle relazioni e fornirà una via per esprimere le proprie opinioni. I gruppi di stakeholder rappresentati includeranno altri professionisti della disinfestazione, scienziati esperti (entomologi, ecologi, epidemiologi, sociologi, matematici), gruppi religiosi, associazioni ambientaliste, politici locali, professionisti e servizi sanitari locali e altre parti interessate come insegnanti di scuola o gruppi comunitari. Incoraggiare le interazioni bidirezionali con questi gruppi garantirà un approccio legittimo. Tutti gli attori locali chiave devono avere informazioni e comprensione accurate, in modo che la divulgazione pubblica attraverso questi canali di fiducia sia corretta e utile (Oliva et al. 2021). La comunicazione del rischio dipende da un'accurata descrizione delle attività SIT pianificate e di come queste si relazionano con le preoccupazioni di rischio che possono essere state sollevate dalle varie parti interessate. Lo sviluppo di un piano di comunicazione includerà il monitoraggio e la valutazione delle attività di

comunicazione. A livello pratico, la SUPSI ha già stabilito una stretta rete di comunicazione con i Comuni coinvolti nel sistema di sorveglianza della zanzara tigre. La comunicazione avviene tra Municipi, uffici tecnici e operatori comunali. A livello pratico, la SUPSI ha già stabilito una stretta rete di comunicazione con i Comuni coinvolti nel sistema di sorveglianza della zanzara tigre. La comunicazione avviene tra Municipi, uffici tecnici e operatori comunali. Inoltre, ogni anno vengono organizzate serate informative per la popolazione su richiesta dei Comuni. Ogni anno la SUPSI realizza anche un'importante campagna attraverso i media per informare i cittadini sui risultati del suo lavoro con la zanzara tigre e per stimolarli ad adottare misure di contenimento dell'insetto sui terreni privati. Nel caso di questa sperimentazione, oltre a tenere aggiornati i Comuni in cui verranno rilasciati i maschi sterili, verranno organizzate serate informative per la popolazione prima dell'inizio dell'esperimento e al termine dello stesso, e verranno lasciati opuscoli informativi presso gli uffici comunali. La SUPSI dispone inoltre di una pagina web dedicata ai cittadini(www.supsi.ch/go/zanzare) in cui vengono descritte le sue attività, compresa la tecnica SIT, e di una e-mail dedicata ai cittadini zanzaratigre@supsi.ch sempre attiva. È inoltre previsto un comunicato stampa generale prima dell'inizio e alla fine della sperimentazione.

LIKELIHOOD LEVELS	CONSEQUENCE LEVELS				
	1 VERY LOW	2 LOW	3 MODERATE	4 HIGH	5 VERY HIGH
1 VERY UNLIKELY	<ul style="list-style-type: none"> • Eradication of target <i>Aedes</i> population leading to ecosystem imbalance [1/1] • Unintentional release of sterile females leading to disease transmission [1/1] • Niche replacement affecting environmental balance [1/1] 	<ul style="list-style-type: none"> • Under-irradiated females increase vectorial competence [1/2] • Niche replacement leading to invasive vectors [1/2] 			
2 UNLIKELY	<ul style="list-style-type: none"> • Exposure to females in the field leading to operator nuisance during release, surveillance and monitoring procedures [2/1] 	<ul style="list-style-type: none"> • Unintentional release of sterile females leading to nuisance [2/2] 	<ul style="list-style-type: none"> • Local opposition to the trials due to inappropriate communication plan for acceptability [2/3] 		
3 MODERATE LIKELY		<ul style="list-style-type: none"> • Exposure to large numbers of sterile male mosquitoes leading to nuisance [3/2] 	<ul style="list-style-type: none"> • Perception of success leading to complacent behaviour affecting vector control challenge [3/3] 		
4 LIKELY					
5 VERY LIKELY					

Tabella 3. Matrice di valutazione dei rischi sanitari/ambientali per le piste di rilascio del SIT contro *Ae. albopictus* in Svizzera. L'intervallo dei valori [intervalli di valori di probabilità/conseguenza] è indicato dopo ogni danno elencato (modificato da OMS/IAEA 2019).

Eleonora Flacio

Dr Eleonora Flacio

Resp. Vector ecology sector / Institute of Microbiology / DACD / SUPSI

Allegati:

- A1. Linee guida CAA per la produzione di maschi sterili.
- A2. Breve rapporto SIT (2022-2024). Nelle prossime settimane sarà redatto un rapporto contenente un'analisi statistica più approfondita che sarà inviato all'UFAM.
- A3. Rapporto per la CFSB: Richiesta di finanziamento per il miglioramento della raccolta e dell'analisi dei dati nell'ambito del progetto di progetto di tecnica del maschio sterile su *Aedes albopictus* in Canton Ticino
- A4. Articolo Bouyer 2024: Stato attuale della tecnica dell'insetto sterile per la soppressione delle popolazioni di zanzare su scala globale
- A5. Bouyer 2024: materiale supplementare (Tabella 1)
- A6. Accettazioni comunali per i rilasci

Bibliografia

- Aldridge RL, Kline J, Coburn JM, Britch SC, Boardman L, Hahn DA, Chen C, Linthicum KJ. 2020. Gamma-Irradiation Reduces Survivorship, Feeding Behavior, and Oviposition of Female *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 36 (3): 152–160.
- Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, Dobson SL. 2010. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10(3):295-311.
- Balestrino F, Bouyer J, Vreysen M, Veronesi E. 2021. Investigating vector competence for chikungunya and dengue viruses among *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes after irradiation. In preparation.
- Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2010. *Mosquitoes and Their Control*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- 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(6):1082-1091.
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., and Carrieri, M., 2013. Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *J Med Entomol.* 50(2): p. 317-25. DOI: 10.1603/me12048.

Bellini R, Carrieri M, Balestrino F, Puggioli A, Malfacini M, Bouyer J. 2021. Field Competitiveness of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Irradiated Males in Pilot Sterile Insect Technique Trials in Northern Italy. *J. Med. Entomol.* 12;58(2):807-813.

Bond JG, Osorio AR, Avila N, Gómez-Simuta Y, Marina CF, Fernández-Salas I, Liedo P, Dor A, Carvalho DO, Bourtzis K, Williams T. 2019. Optimization of irradiation dose to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in a sterile insect technique program. *PLoS One* 14: e0212520.

Bouyer, J., Yamada, H., Pereira, R., Bourtzis, K., and Vreysen, M.J., 2020. Phased conditional approach for mosquito management using sterile insect technique. *Trends in Parasitology.* 36(4): p. 325-336.

Bouyer J. 2024. Current status of the sterile insect technique for the suppression of mosquito populations on a global scale. *Infectious Diseases of Poverty,* 13:68

Carrieri M, Angelini P, Venturelli C, Maccagnani B, Bellini R. 2011. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population size survey in 2007 Chikungunya outbreak area in Italy. I: Characterization of breeding sites and evaluation of sampling methodologies. *J. Med. Entomol.* 48:1214–1225.

Cunningham CA, Aldridge RL, Kline J, Bibbs CS, Linthicum KJ, Xue RD. 2020. Effects of radiation on blood-feeding activity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 45:140–141.

Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. 2005. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management,* Springer, Dordrecht, The Netherlands.

ECR European Court Reports, 111/18 (2018). *Confédération paysanne and Others v. Premier ministre and Ministre de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt* Case no. C-528/16.

FAO. 2005. *ISPM No. 3: Guidelines for the Export, Shipment, Import and Release of Biological Control Agents and Other Beneficial Organisms,* 2005, FAO, Rome, Italy.

Fouque F, Guidi V, Lazzaro M, Ravasi D, Martinetti-Lucchini G, Merlani G, Tonolla M, Flacio E. 2020. Emerging *Aedes*-Borne Infections in Southern Switzerland: Preparedness Planning for Surveillance and Intervention. *Travel Medicine and Infectious Disease* 37: 101748.

Hawley WA. 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc.* 1: 2–39.

McInnis DO, Lance DR, Jackson CG. 1996. Behavioral resistance to the sterile insect technique by Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. *Ann Entomol Soc Am.* 89:739–44.

Valutazione dell'efficacia della tecnica del maschio sterile contro *Aedes albopictus* (zanzara tigre asiatica) in diversi ambienti urbani come misura di controllo integrato nell'ambito del programma Join TDR OMS/IAEA.

Oliva CF, Benedict MQ, Collins CM, Baldet T, Bellini R, Bossin H, Bouyer J, Corbel V, Facchinelli L, Fouque F. 2021. Sterile Insect Technique (SIT) against *Aedes* Species Mosquitoes: A Roadmap and Good Practice Framework for Designing, Implementing and Evaluating Pilot Field Trials. *Insects* 2021, 12, 191.

Ravasi D, Parrondo Monton D, Guidi V, Flacio E. 2020. Evaluation of the Public Health Risk for Autochthonous Transmission of Mosquito-Borne Viruses in Southern Switzerland. *Med. Vet. Entomol.* 34 (2): 244–50.

Ravasi D, Topalis P, Puggioli A, Leo C, Flacio E, Papagiannakis G, Balestrino B, Martelli M, Bellini, R. 2024. Random mutations induced by a sub-sterilizing dose of gamma ray on *Aedes albopictus* male pupae and transmission to progeny. *Acta Tropica*, Vol. 256, 107271,

Shetty V, Shetty NJ, Harini BP, Ananthanarayana SR, Jha SK, Chaubey RC. 2016. Effect of gamma radiation on life history traits of *Aedes aegypti* (L.). *Parasite Epidemiol. Control.* 1(2): 26-35.

Tur, C., Almenar, D., Zacarés, M., Benlloch-Navarro, S., Pla, I., and Dalmau, V., 2023. Suppression Trial through an Integrated Vector Management of *Aedes albopictus* (Skuse) Based on the Sterile Insect Technique in a Non-Isolated Area in Spain. *Insects.* 14(8): p. 688.

Vavassori L, Saddler A, Müller P. 2019. Active dispersal of *Aedes albopictus*: a mark-release-recapture study using self-marking units. *Parasit. Vectors* 12, 583.

Whitten M, Mahon R. Misconceptions and Constraints. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer: The Netherlands, 2005, 601–626.

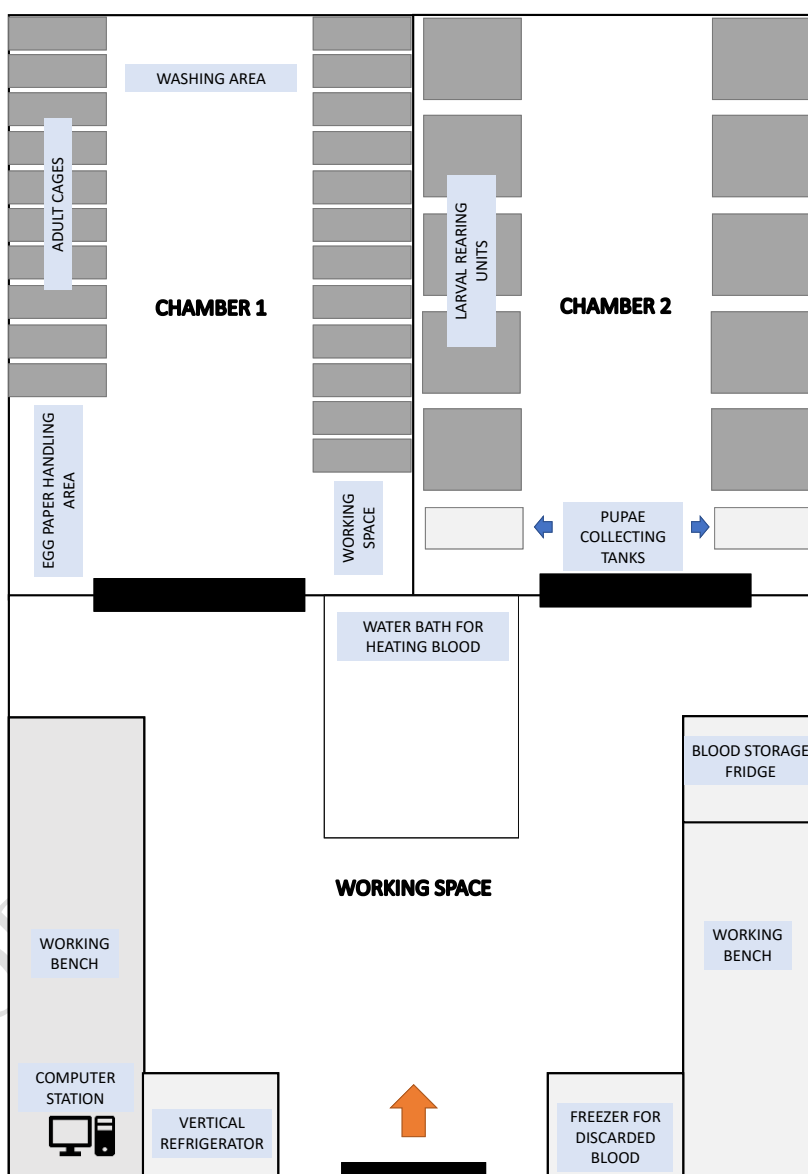
WHO / IAEA. Guidance framework for testing the sterile insect technique as a vector control tool against *Aedes*-borne diseases. 2020. Geneva: World Health Organization and the International Atomic Energy Agency; Framework for health and environmental risks assessment. Ch. 02: 31-47.

Purpose

As part of the SIT industrialization process for the control of *Aedes albopictus*, it is necessary to develop methodologies aimed at the automation and standardization of the various phases that lead to the production of sterile males.

This SOP intends to define all the procedures necessary for the production of sterile males, which can be subjected to improving changes.

1. MOSQUITO MASS PRODUCTION FACILITY PLAN



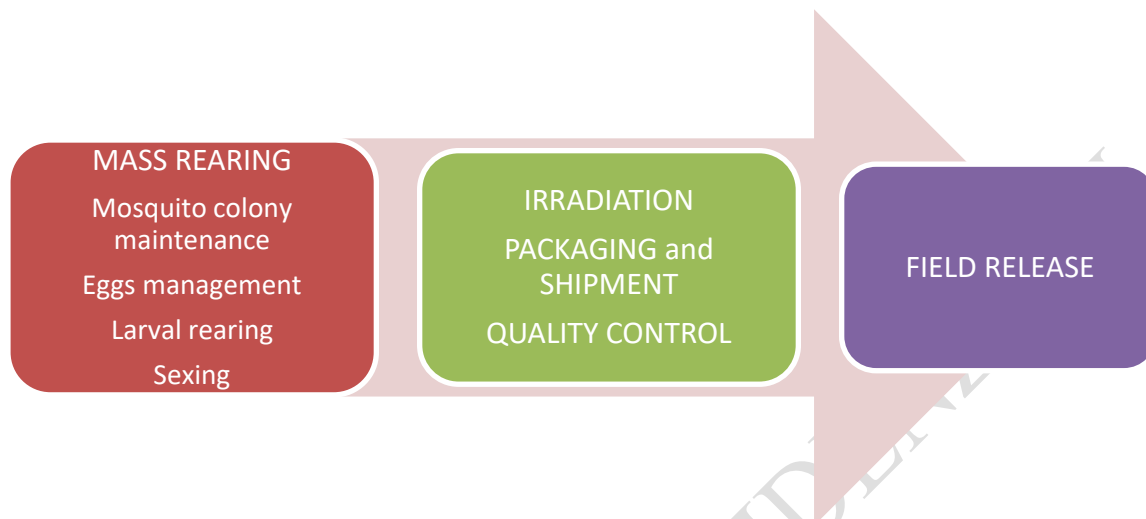
CLIMATIC CHAMBER 1: maintenance of mosquito colonies ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$, $92\pm 3\%$ RH, 14:10 L:D).

CLIMATIC CHAMBER 2: larval rearing ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$).

WORKING SPACE: activities related to the sterile males production (20°C).

Area of the SIT module: 85 sqm.

2. SIT PRODUCTION FLOW



3. MOSQUITO MASS REARING

3.1 Adult colony maintenance

Each adult cage is labeled with an ID code and has a data sheet which is filled with the data related to the cage.

The cages are loaded with about 3000 male pupae and 10000 female pupae in order to have a sex ratio M/F=1/3 to optimize egg productivity. For each rearing cycle, 4 blood meals and two egg collections are made. The first blood meal is scheduled 6-7 days after inserting the female pupae. At the end of each rearing cycle, the data collected on the description sheet will be recorded in the DB for analysis and quality control.

Blood supply and management

The blood is collected every week at Macellazione Trasformazione Carni Valpa in San Felice sul Panaro (MO) in via Grande, or at Azienda Rubizzani in Camposanto (MO) in via Prato Grasso. The swine or bovine blood (10-15 L) is collected and transported in dedicated plastic containers. The transport document must be filled and signed by the supplier following the procedure for using animal by-products.

The blood must be defibrinated immediately upon arrival using a mixer and placed in the fridge dedicated to blood storage. The residual blood must be disposed following the procedure for the use of animal by-products.

3.2 Eggs management

Once removed from the cage, egg papers are left to dry for 24 hours. The egg papers are then placed in a closed box for at least 7 days before hatching. The eggs are brushed off each paper and weighed. The brushed eggs can be stored at 25-28°C and 80-85% RH for several days before use. The hatching rate of *Ae. albopictus* eggs is progressively reduced within 6 months.

Eggs and diet are directly incorporated into each rearing tray using T 0 vegetable and transparent capsule (GALENO srl). Each capsule contains 110 mg eggs and 225 mg diet, for a total weight

of 335 mg. Since hatching, a progressively increasing quantity of larval diet is provided daily until pupation.

3.3 Larval rearing and sexing

Each rearing unit is labeled with an ID code and has a data sheet which is filled with the data related to the unit.

The trays are filled with water the day before placing first instars to allow water temperature to stabilize. Larvae are fed for 5 days with a mix of Premium Growth Substrate (INNOVAFEED) and KOI fish food (50:50).

The day after pupation onset, pupae are collected and sexed by means of manual separators (Fay-Morlan) or automatic sex sorter.

At the end of each rearing cycle, the data collected on the description sheet will be recorded in the DB for analysis and quality control.

4. IRRADIATION

Male pupae aged 2-48 hrs are irradiated inside a carbon canister of 1.8 litre capacity, using the RADGIL X-ray irradiator (20 rotations/min and delivered dose ratio of 4.5 Gy/min). A dose of 40 Gy was selected to irradiate batches of 30,000 males in 250 ml water.

5. PACKAGING and SHIPMENT

In order to keep to a minimum the size of the package for the shipment of adult mosquitoes thus reducing also the cost of shipment and standardize the conditions of transport, the following procedures are adopted.

After irradiation, the male pupae are left to emerge inside grey plastic emergence tubes (11 cm diameter, 30 cm length) with netted top and bottom, placed vertically inside a plastic tray filled with water to a depth of about 2 cm in climatic controlled condition ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ RH, 14:10 L:D). Each tube contains around 2200 pupae and provided a vertical resting surface area of about 1.3 sqcm per adult (supplementary resting surface fixed inside each tube). To assure adult nourishment, 10% sugar solution is sprayed along the surface of each tube and cotton pads imbedded in it are placed on the top of the netted lid. The tubes are maintained for two/three days to allow complete adult emergence and then carefully removed from water to dry and stacked horizontally in a refrigerated cabinet ($8\pm 1^{\circ}\text{C}$) for about 15 minutes before packaging.

The cold shock anaesthetized sterile males are then transferred into white or transparent cups by carefully shaking each tube, with the help of a plastic funnel to ease the pouring of the males inside each cup, and then the males are divided into two cups in order to have around 1000 males per cup. These cups are then stacked on top of each other and inserted in groups of up to 20 cups inside a cardboard cylinder (120 mm diameter, 180 mm height, cardboard thickness 3 mm); a maximum of four cylinders could be vertically stored in each package (80,000 males per box). The polystyrene box (outside dimension 35 x 35 x 48 h cm, wall thickness 5 cm, 25 l capacity; CB-30 Dryce) is placed inside a cardboard box with the appropriate labels requested by the express courier (Figure 1).



Fig. 1 – A) Polystystrene container; B) emerging tube (max. 2200 pupae); C) plastic cups for the adults; D) cardboard cylinder to hold cups; E) PCM gel packs (Blue Ice and Green Ice to maintain cooling during the transport of *Aedes albopictus* males.

Usually, the mosquitoes are delivered within 24 hours from CAA facility to the release areas. The temperature and humidity are recorded by means of a data logger placed inside the package (Figure 2).

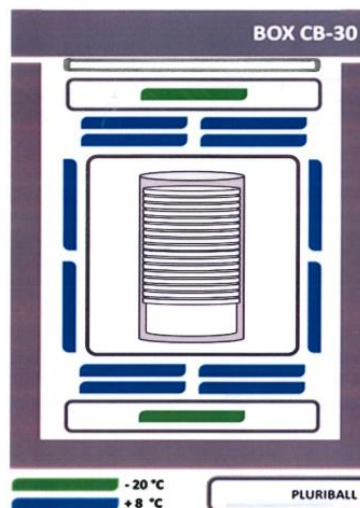


Figure 2. Scheme of the adult mosquito shipment packaging.

The label "UN3373 BIOLOGICAL SUBSTANCES CATEGORY B" is attached to the cardboard box (Figure 3).

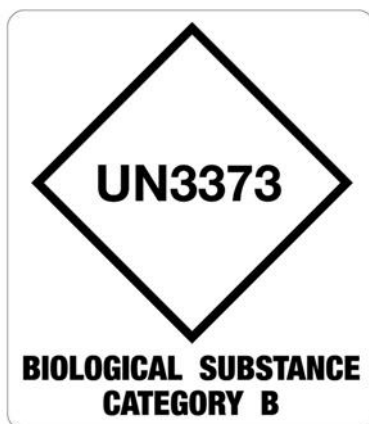


Fig. 3. Label to be attached to the package containing the sterile males to be shipped.

In the case of releases without the need for an express courier, once the emergence of mosquitoes is complete, the tubes are placed in polystyrene containers and transported in the field in the predefined release area.

6. QUALITY CONTROL

Sex ratio control

For each batch of male pupae, a sample of at least 300 pupae is taken and sexed under a stereomicroscope. The sex ratio should be $\leq 1.00\%$. In case of sex ratio $> 1.00\%$, a new separation cycle is carried out.

Flight capacity

The flight ability of the males is periodically checked using both flight tubes and aspirator tubes.

7. FIELD RELEASE

For the mosquito releases, the actions to follow are:

- Preparation of boxes or tubes for shipment and transport to the release area;
- Preparation of shipping packages with boxes;
- Preparation of the release area: release on foot, by car, by bike, by drone;
- Definition and georeferencing of the release points or the release path;
- DHL management for shipments (if required).

8. LIST OF EQUIPMENT

The SIT module is provided with the following equipment:

- n. 80 mass rearing cages;
- n. 10 larval rearing units;
- n. 1 stereomicroscope;
- n. 1 automatic sex sorter;
- n. 3 manual separator (Fay-Morlan);
- n. 2 laboratory scales;
- n. 1 water bath;
- n. 1 mill to mince the larval diet;
- n. 1 mixer to defibrinate blood;
- n. 100 emergence tubes;



- n. 1 vertical fridge;
- n. 1 fridge dedicated to fresh blood storage;
- n. 1 freezer dedicated to discarded blood.

9. WORKING PERSONNEL SAFETY

In order to reduce the risks associated with the activities described in this SOP, the personnel in charge should use the personal safety protection devices (SPD) as indicated in the risk assessment document for the tasks of the laboratory technician (gloves and lab coat).

10. ETHICS STATEMENT AND SANITARY REGULATION

Research carried out on invertebrates such as mosquitoes do not require a specific permit according to the directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes.

The blood used for blood-feeding of mosquitoes is collected during routine slaughtering of pigs or cows in national authorized abattoirs at the highest possible standards strictly following EU laws and regulations.

CAA is authorized by the Emilia-Romagna Public Health Department to use animal by-products under the Regulation (EC) No. 1069/2009 that indicates the sanitary rules for the use of animal by-products and derived products not intended for human consumption.

The request for the authorization of the use of insect food as animal by-products is in progress.

SUPSI

Final Report

Project title: **Pilot project for the application of the sterile insect technique on *Aedes albopictus* in Canton Ticino (2022-2024)**

Project leader: Dr. Eleonora Flacio
Istituto microbiologia (IM)
SUPSI
Via Flora Ruchat-Roncati 15
CH-6850 Mendrisio
eleonora.flacio@supsi.ch

TABLE OF CONTENTS

1. General considerations	3
2. 2022 preliminary test: single release	4
2.1 Purpose	4
2.2 Materials and methods	5
2.2.1 Production of sterile males and shipment	5
2.2.2 Release area and field experiment	5
2.2.3 Sterile male residual fertility	6
2.2.4 Information to citizens	6
2.3 Results	6
3. 2023 and 2024 pilot tests	7
3.1 Materials and methods	7
3.1.1 Study area	7
3.1.2 Study design	8
3.1.3 Production and shipment of sterile males	8
3.1.4 Releases	9

SUPSI

3.1.5	Monitoring of mosquito population: egg density and viability.....	10
3.1.6	Monitoring of mosquito population: adult density	11
3.2	Results	12
3.2.1	Production of sterile males and shipment	12
3.2.2	Quality of males: sterile male residual fertility	13
3.2.3	Releases of sterile males.....	13
3.2.4	Monitoring of mosquito population: egg abundances and viability.....	13
3.2.5	Monitoring of mosquito population: adult abundances	14
3.2.6	Difference between areas in the release municipality	15
3.2.7	Mark, release, recaptures of sterile males	16
3.2.8	Communication to citizens	17
3.3	Discussion.....	17

1. General considerations

Aedes albopictus, also called tiger mosquito, is an invasive allochthonous species that is established in most of the territory of the Canton Ticino since almost 20 years and is also recently expanding in other regions of Switzerland (Invasive Mosquitoes – Swiss mosquito network, <https://www.zanzare-svizzera.ch/>). This species of mosquito is considered one of the most dangerous invasive species in the world, for its ability to spread and to transmit exotic viral diseases such as dengue, chikungunya and Zika. In fact, worldwide the resurgence of such *Aedes*-borne disease outbreaks underscores the limitations of conventional vector control programs, which are heavily focused on insecticide application and the elimination of larval breeding sites. Challenges include the development of insecticide resistance, the presence of cryptic breeding sites, insufficient infrastructure or government support and high costs. The tiger mosquito is also of tremendous nuisance to citizens, who unfortunately may react by applying biocides in an uncontrolled manner, thus causing health and environmental risks. Thus, there is a pressing need for innovative, sustainable and cost-effective control strategies targeting *Aedes* mosquitoes, particularly *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, the two major vectors of arboviruses that together are responsible for more than 99% of arbovirus transmission within human populations.

In Canton Ticino, *Ae. albopictus* is currently managed with satisfactory results, through larval control and community participation. So far, there have never been any cases of local transmission of the above-mentioned diseases, thanks also to an action plan prepared in collaboration with the World Health Organization (WHO) and coordinated by the office of the cantonal doctor. Nevertheless, the remaining population densities are estimated to be high enough to cause a potential risk of transmission of exotic diseases. It is difficult to keep the dedication the population consistent and, it must be said, there is an objective difficulty in identifying the totality of tiger mosquito breeding sites, since many of them are cryptic.

TDR (the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases co-sponsored by UNICEF, UNDP, the World Bank and WHO), together with the International Atomic Energy Agency (IAEA), strongly encourage the application of the Sterile Insect Technique (SIT) to mosquitoes, because traditional biocides are losing effectiveness worldwide due to resistance and SIT is a targeted control system with no known environmental or health impact. Indeed, SIT is a genetic control method that has been largely applied to prevent, suppress or eradicate key insect pest of agricultural, sanitary and veterinary importance over the past 60 years. In this technique, it is the mosquitoes that go looking for mosquitoes.

In Europe, nowadays resistance genes to some adulticides are rapidly spreading. Adulticide biocides are not used in Switzerland in regular control activities but are needed when it is necessary to carry

out extraordinary control measures once the risk of disease transmission occurs. If the public does not use this kind of biocides, more and more citizens are installing automatic devices that apply this kind of products, increasing this way the risk of the resurgence of resistance. The SIT technique could be a useful tool to decrease this risk. The SIT is still expensive, but mass production facilities are improving constantly, and the costs are reducing every year.

The purpose of this project, carried out under WHO's solicitation, is to test whether the application of sterile male tiger mosquitoes in the already applied integrated control system in Canton Ticino could lead to a further decrease in the presence of the insect, and to assess what significance it has both in terms of annoyance to citizens and risk of disease transmission. To this end, it is worthwhile to conduct these assessment release trials and obtain initial data and improve this methodology with the aim to applicate it in Switzerland. Indeed, this pilot project provides the first detailed application in Switzerland with the SIT technique. Once the efficacy will be proved, it might be appropriate to have local production facilities that will facilitate access to sterile males to the cantons, regions or municipalities that will request them as an integrated control tool. Canton Basel City and Canton Grisons as well as some municipalities of Canton Ticino have already shown interest in that sense.

The project is a collaborative effort of the Institute of Microbiology, SUPSI (Dr Eleonora Flacio, Vector Ecology Group), the Centre Agriculture and Environment "Giorgio Nicoli" (CAA, an IAEA Collaborating Centre, Crevalcore, Italy) (Dr Romeo Bellini), whereas TDR WHO (Dr Florence Fouque) and IAEA (Dr Jérémy Bouyer) have assured scientific and technical support to the project. The experiments were carried out over two years, 2023 and 2024, to obtain more solid data. In 2022 a single release had been already performed, not yet with the purpose to demonstrate the decrease of tiger mosquitoes in the territory, but to gain mastery and useful field parameters to best carry out the full pilot experiment supported by this contract.

2. 2022 preliminary test: single release

2.1 Purpose

With the 2022 single release, we wanted to assess whether there were any difficulties in implementing the SIT regarding different parameters (e.g., transportation, customs, public acceptance). We also evaluated survival and dispersal of released males, as well as their residual fertility. Also important was the consolidation of collaboration with CAA, the producers of the sterile mosquito males.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Production of sterile males and shipment

CAA produced sterile males from Canton Ticino's *Ae. albopictus* strains (11 generations). Pupae (20-40 hours old) were irradiated with 55 Gy (Radgil2). 22,500 sterile adult males (kept at 8-10°C for 30 min) were tagged with fluorescent powder (FAO/IAEA 2020), refrigerated, packed in stacked plastic cups at 10-12°C and transported by car (3 hours) to the field site in Morcote.

2.2.2 Release area and field experiment

A permit was obtained from the Federal Office for the Environment (FOEN), according to the Ordinance on the Handling of Organisms in the Environment (No. 814.911), to release sterile male tiger mosquitoes in Morcote in 2022 (BAFU-217.23-64633/7). The same permit was also valid for the releases carried out in 2023. On the 2nd of August at 18:00 local time, 22,550 marked (pink) sterile males, contained in cups (1,500 males/cup), were released in the municipality of Morcote (**Fig. 1** yellow star). Mortality and female presence were checked after 1 hour. In the following days (3rd-9th August) Mark Release Recaptures (MRRs) were performed between 18:00 and 19:30 by Human Landing Collections (HLCs) with manual battery aspirators and black boxes, 5 min/collection point. Four field technicians were daily rotating in 32 collection points (8 collection points/technician) (**Fig. 1** red dots). The MRR area was divided into four concentric circles 50 m apart in which HLC points were evenly distributed (distance between contiguous points 50-100 m). HLCs were carried out in areas ideal for mosquitoes to rest (shaded and close to vegetation). No HLC was carried out in windy and stormy days. Collected mosquitoes (males and females) were killed by freezing and brought to the laboratory for checking the presence of the coloured marking using a stereomicroscope.

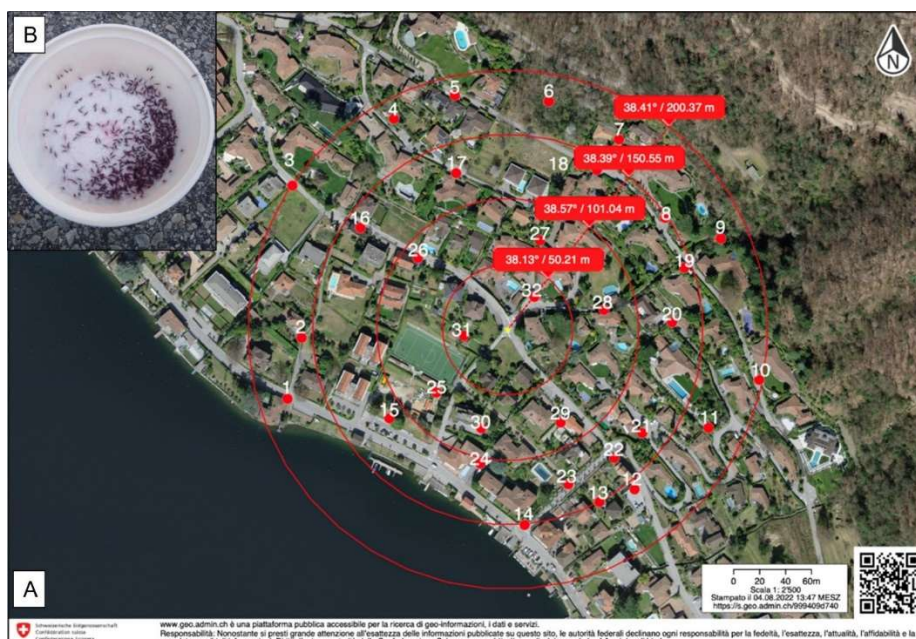


Figure 1. A) Release point (yellow star) and HLC points (red dots) in Morcote. B) Marked sterile males. Map created in <https://map.geo.admin.ch/>.

2.2.3 Sterile male residual fertility

Radiation reduces mosquito viability, so the dosage is adjusted so that mosquitoes are still able to mate. The residual fertility of the released males was tested in the laboratory by mating 200 irradiated males with 200 non irradiated females. An equal number of non-irradiated males and females were used as control. The egg hatching protocol of IAEA was applied and residual fertility checked.

2.2.4 Information to citizens

The media were invited to the release and several interviews were given in the following days.

2.3 Results

No transportation problems occurred.

Among the 22,500 sterile males, 20,085 were successfully released and 2,415 mosquitoes (10.73%) were not able to fly, of which 10 were females. Therefore, the residual presence of females was assumed to be about 0.41%.

The 6th and 7th August stormy wind was present, so no HLC recaptures were performed.

Only *Ae. albopictus* were collected with MRR. Based on the rate of sterile male recaptures (0.21%), the daily survival rate of sterile males was $SR=0.59$ while the average life expectancy (ALE) was 1.89 days. Relative humidity during the days 2nd-6th August ranged 56-59%, which is low for the survival of *Ae. albopictus*, while during the days 7th-9th August it ranged 67-80%, which is ok.

The mean distance travelled by the sterilized males was 90.95 m and the maximum distance was 175 m.

The non-irradiated-male control carried out at SUPSI's laboratory suggested a natural egg fertility of 87.6%, while the test with irradiated males and wild females showed a residual fertility of 1.5%. The sterility level agreed with expectations.

As a follow-up to the experiment, there were more than 20 media runs throughout Switzerland (television, radio, newspapers). All interested in the experiment. There were no negative comments. Some municipalities expected the technique to be adopted already in the regular surveillance and control system in Ticino Canton in 2023.

3 2023 and 2024 pilot tests

3.1 Materials and methods

3.1.1 Study area

The study was conducted in the central region of Canton Ticino, in two municipalities on the shores of Lake Ceresio. Both municipalities are part of the integrated surveillance and control system against invasive mosquitoes in place in Canton Ticino since 2009. Control measures consist of public catch basins treatments with VectoMax® FG (every 8 weeks between May and September), while private areas should be managed by citizens, who are invited, through an information campaign (www.supsi.ch/go/zanzare), to use VectoBac® G weekly between May and September and to remove larval breeding sites. The releases were carried out in the municipality of Morcote, in an urbanized area of about 45 hectares (**Fig. 2**). This area is bordered by woods and the lake and could only be affected by introductions of wild female and male mosquitoes on the south-eastern side, which borders the town of Vico Morcote. The municipality of Caslano, about 5 km away in a straight line from the test area and with similar climatic and housing characteristic, was chosen as control (**Fig. 2**). To reduce the workload, the entire municipal area of Caslano was not used, but only 14 hectares was used as a control, which corresponds to about 30% of the test area. No additional control measures other than those already part of the surveillance and control system were carried out during the study period.

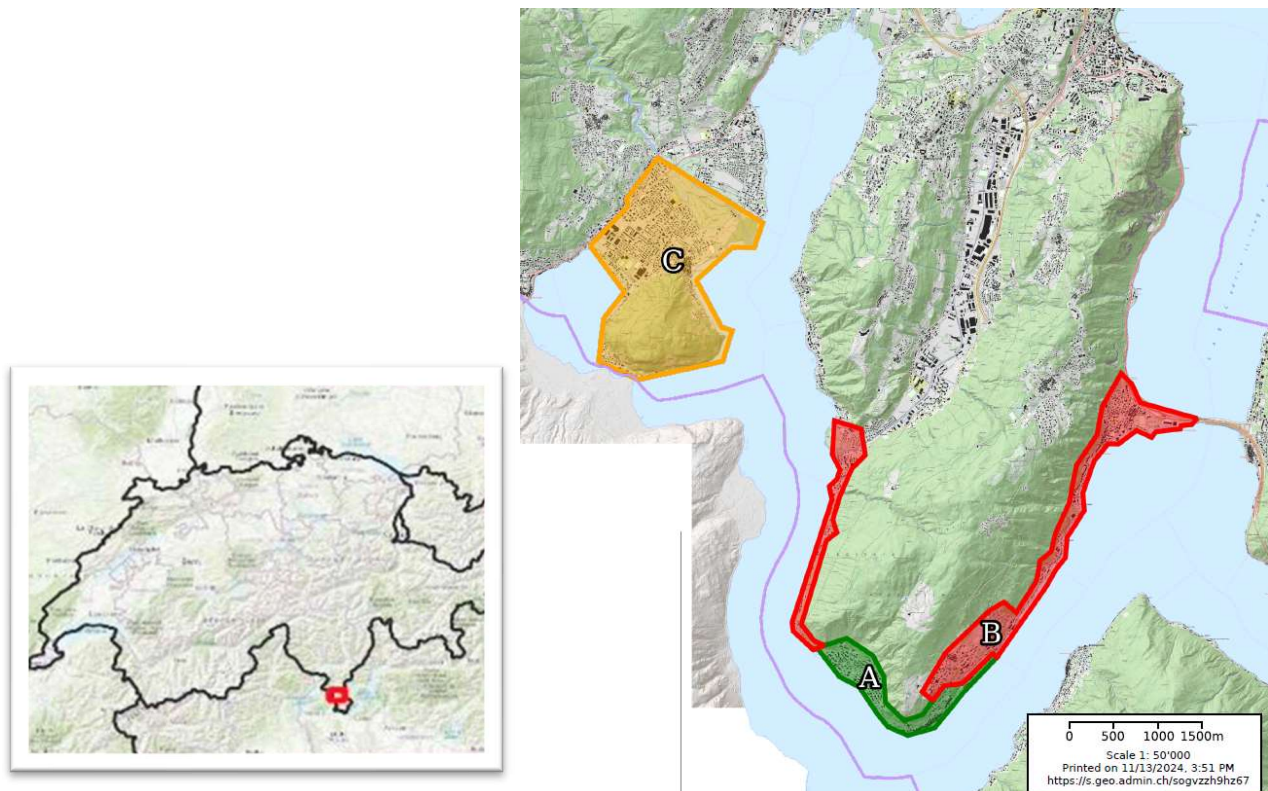


Figure 2. The study area. A: SIT trial area, 45 ha, Morcote. C: control area, 14 ha, Caslano. B: Buffer area, Morcote, 150 ha, active only in 2024. Map created in <https://map.geo.admin.ch/>.

3.1.2 Study design

In 2023 and 2024, regular releases of unmarked sterile males of *Ae. albopictus* were carried out in the municipality of Morcote (**Fig. 3**) during the mosquito reproductive season (May to end of September). Mosquito populations in the release (Morcote) and control (Caslano) areas were monitored weekly from mid-April to mid-October with egg traps. Egg density and fertility was determined. In parallel to the releases, adults were collected by traps in both the test and control areas to assess the reduction in the density of adult females and adult competitiveness. Three MRRs were also conducted in Morcote, releasing sterile males at the same location where the preliminary MRR test was conducted in 2022 (**Fig. 1**). These tests were conducted from May to September and involved the release of tagged sterile males at a single location, followed by their recapture at monitoring stations with adult traps evenly distributed within a 200-m radius of the release point.

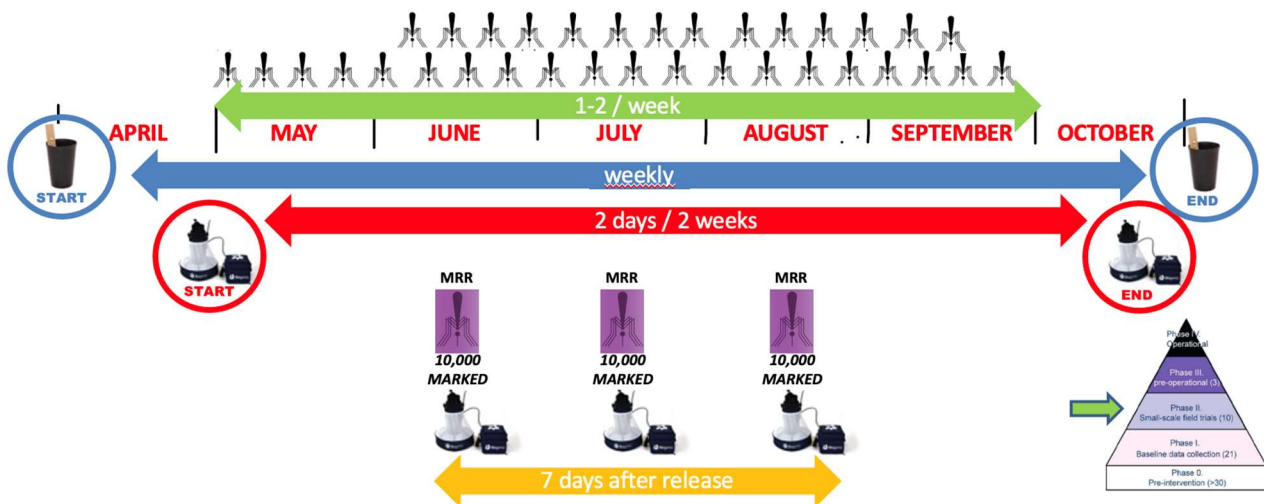


Figure 3. Outline of the activities carried out in 2023 and 2024 for the SIT pilot tests.

3.1.3 Production and shipment of sterile males

Sterile males of *Ae. albopictus*, whose strain came from eggs collected in Canton Ticino, were routinely produced by CAA by X-ray radiation (40 Gy in 2023 and 35 Gy in 2024) of 2-48 hours old pupae in water (Balestrino et al. 2014). The males were two to four days old at the time of release and were powder-marked (according to IAEA protocol) only in case of MRR testing. The main transport box for the sterile males consisted of a polystyrene box with cardboard tubes inside, which contained the cups (12 cm diameter) with the mosquitoes. The temperature in the shipping packages was maintained at 8-12°C and 80% RH (verified by data loggers inserted in the packages) to keep the sterile males in a state of dormancy during the journey. The polystyrene box was surrounded by cooling packs and bubble wrap to maintain temperature and airtightness. Tests were also conducted with other types of transport containers, such as the box recommended by the IAEA with plastic carrying cases, as well as with a refrigerated suitcase and bag for transportation by train.

In May, a shipment of sterile males was sent to verify the correct distribution through courier services. With these mosquitoes, a wake-up test was conducted to understand how the duration of stay in the packages affected male mortality. We observed that 1) males that move within the release cups after one hour but are not able to fly cannot be considered alive; 2) even with the package completely sealed and isolated, after 24 hours the mortality increases by 17%. The sterile males were transported to destination by express courier (estimated 18 hours) or directly by CAA or SUPSI operators via train/car (3 hours). The second option was implemented to reduce transport time, because excessive mortality rates were observed with courier transportation.

Radiation reduces mosquito viability. Therefore, the radiation dose is calibrated to ensure that mosquitoes retain the ability to mate. To monitor the quality of the released sterile males, a random assessment of their residual fertility was performed three times during the experiment in the receiving laboratory. A random sample of about 200 sterile males was placed in a small cage together with about 200 virgin females. The mosquitoes were fed with sugar solution and the females were fed blood twice on days 3 and 4 from introduction into the cage. The eggs produced were allowed to mature for one week and then subjected to the IAEA hatching protocol. A similar procedure was adopted with non-irradiated males as an untreated control.

3.1.4 Releases

Upon arrival to the receiving facility, sterile males were immediately transferred to the release site in Morcote. Approximately 3,000 sterile males per hectare per week were released by means of 75 predefined release stations spaced 50-80 m apart, with 2,000 males per week released at each station evenly distributed throughout Morcote (**Fig. 4**).

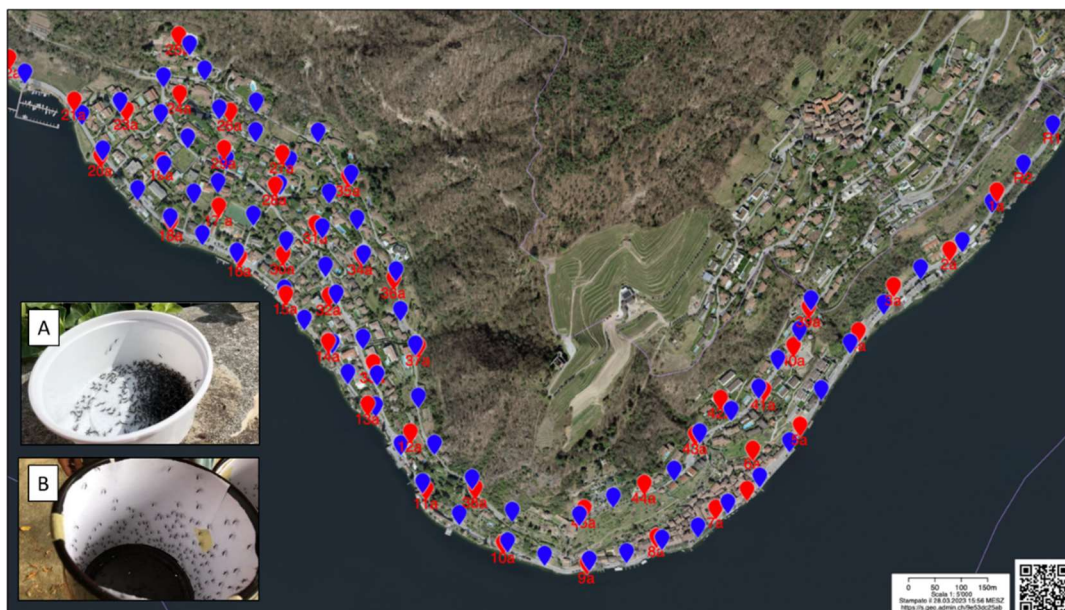


Figure 4. Morcote aerial map with the 75 sterile male release points (blue) and 45 ovitraps (red). A and B: cups tested for release. A: plastic ice cream cup. B: cup made from ovitraps with mosquito walking surface. Map created in <https://map.geo.admin.ch/>.

The most suitable method for the release of sterile males in this trial involved the creation of 75 release stations that contained 8 cm x 12 cm plastic containers (like those used for ice cream) with a sanded interior or the cup part of an ovitrap with white card inside. These containers were hung on a string and coated with Vaseline to prevent the entry of ants (**Fig. 4**). This system is highly effective as it allows for a quick and efficient release of sterile males in many areas.

Once the males were released, their mortality was checked by counting the number of adults that did not fly out of the container after one hour in a sample of 5 randomly selected release stations. A high mortality rate was found during the experiment, so it was decided to decrease the density of males per cup by placing only 1,000 males and then arrange 2 cups per release point.

Also, during the hottest period of the season and following the MRRs' survivorship results, two weekly releases of 75,000 males each were made to ensure the activity of sterile males throughout the week. In summary, in May, June and from the second half of September (cooler period) males were released once per week. From July to mid-September (warmer period: minimum temperature above 20°C and maximum temperature above 30°C), males were released two times per week (on Tuesday and on Friday). In total, 34 releases were carried out and 3,450,000 sterile males were released during the season, with 3,000 sterile males released per hectare per week.

3.1.5 Monitoring of mosquito population: egg density and viability

Population density and fertility were monitored in the release and control areas using ovitraps, which consisted of black plastic jars (Ramona Ø13/H12, Luwasa® Interhydro AG, Allmendingen, Switzerland) containing each a steamed beechwood slat (200 x 25 x 5 mm) that served as oviposition support. The jars, which were provided with a top border efflux hole, were filled with tap water to act as a breeding site. In 2023, 45 ovitraps in Morcote and 14 in Caslano (one ovitrap per ha, **Fig. 5**). In 2024, 33 ovitraps were added in Morcote to better monitor the buffer area around the release sites and six ovitraps were added in Caslano to cover more completely the study area. Ovitrap control rounds were monitored, weekly in 2023 and every two weeks in 2024, throughout the season starting as early as 2 weeks before releases (mid-April) and ending 2 weeks later (mid-October). The wooden slats were replaced with new ones and taken to the laboratory. *Aedes albopictus* eggs were differentiated from the other species via optical species determination (Anicic et al. 2023) and counted.

Fertility of the eggs was checked performing hatching (**Fig. 5**) and then counting the eggs again using the same methodology as described above. Due to workload issues, fertility was checked every two ovitrap control rounds.

To check the possible border effect of sterile males from the trial area, ovitraps located in Vico Morcote, the municipality bordering Morcote, which are part of the normal *Ae. albopictus* surveillance system in the Ticino region, were checked for eggs densities and residual fertility every two weeks, with the same protocol.

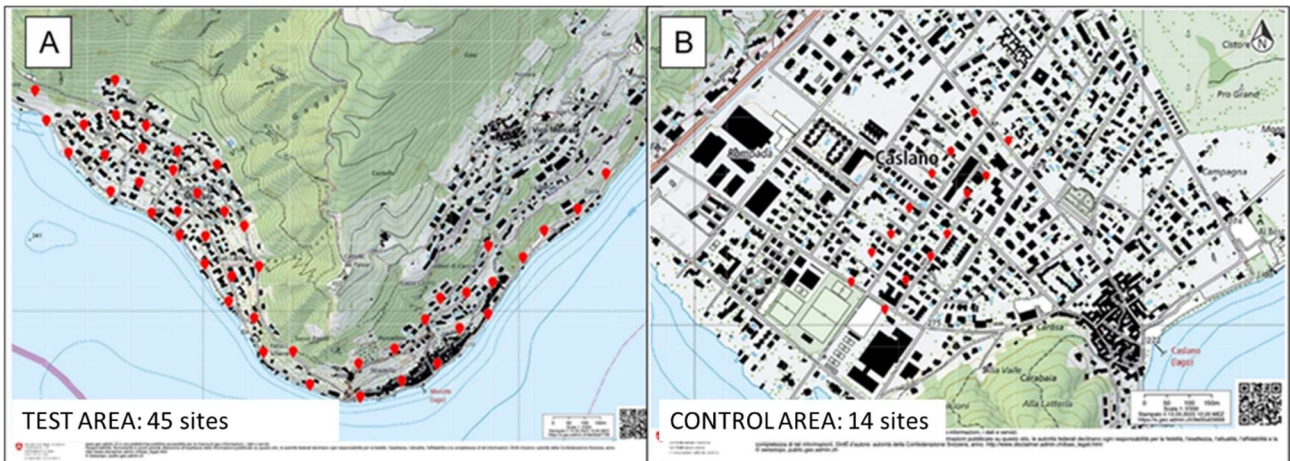


Figure 4. Ovitrap locations (red points): trial area (A); control area (B).

Egg collection	Step 1. Collect the oviposition substrates and keep them wet (use wet kitchen paper to wrap them). IMPORTANT NOTE: eggs should not dry during the trip from the field to the laboratory (avoid leaving the eggs in the car, under the sun).
Egg storage	Step 2. Oviposition substrates should be left in the wet paper under standard laboratory conditions (25±1°C, 80% RH, 14:10 L) for 1 day to dry. Step 3. The next day the oviposition substrates are placed in a sealed plastic container at 23°C to embryonate for one week.
Hatching solution	Step 4. Preparation of hatching solution. The maternal solution is prepared using 12.5 g broth (Nutrient Broth OXOID) + 2.5 g yeast powder/100 ml of deionized water. IMPORTANT NOTE: The hatching solution must be used immediately and cannot be stored.
Hatching	Step 5. For egg hatching, 1 L volume glass jars with caps are used. Use 700 ml of deionized water and 2 ml of the hatching solution in each pot. Put 5 oviposition substrates in one glass jar. The jars must be hermetically closed at 28°C and opened 20-24 hours later (not before 16 hours). Count the hatched and unwatched eggs under the stereomicroscope.

Figure 5. Egg hatching protocol.

3.1.6 Monitoring of mosquito population: adult density

Adult mosquitoes were collected in the study areas using the modular adult trap Biogents BG-Pro in sentinel mode baited with CO₂. (Fig. 6). This type of trap is powered by a power bank and can be conveniently transported and installed. We chose to produce CO₂ on site through yeast fermentation in concealable blue bags (<https://eu.biogents.com/bg-co2-generator/>) because dry ice was difficult to get hold of on a regular basis, and the CO₂ canisters on hand were too conspicuous and might have caused alarm to the citizens.



Figure 6. BG-Pro trap in sentinel more, baited with CO₂ (blue bag on the right).

Adult density was monitored from the beginning of May until the end of September. Morcote had 25 evenly distributed sampling sites, each consisting of one BG-Pro (1 trap / 2 hectares), while Caslano had 8 sampling sites composed in the same way as Morcote.

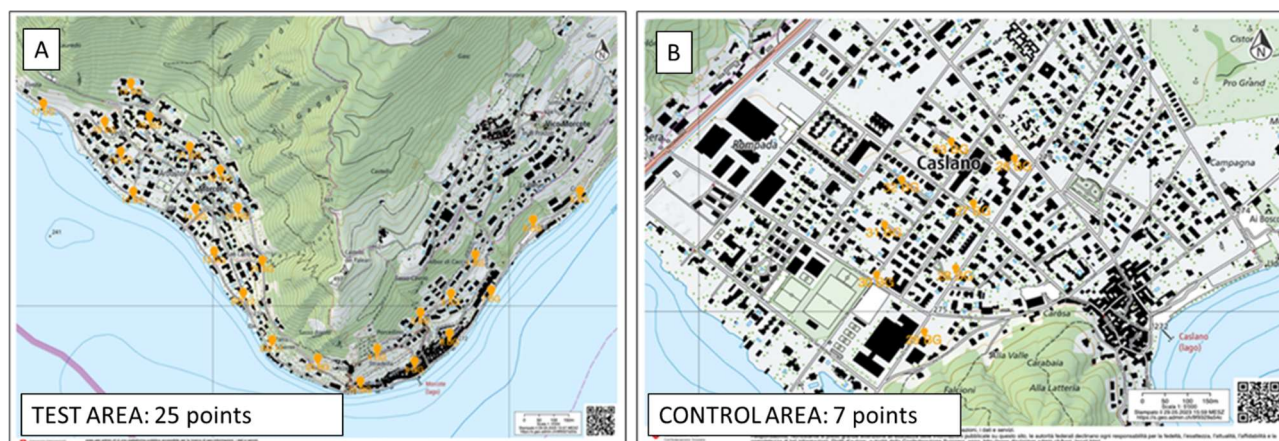


Figure 7. BG-Pro traps (orange dots) test area (A); control area (B) (1 trap / 2 ha).

Traps were displayed every two weeks, 24 hours after the release, and checked after 40-48 hours. This monitoring was useful to determine parameters such as sex ratio, competition, population density of females, reduction in female density etc. Samples collected were labeled and frozen in the laboratory for later identification. The identification was be done using a stereomicroscope and the *Ae. albopictus* individuals were counted by sex.

3.2 Results

3.2.1 Production of sterile males and shipment

There were no issues with the production of sterile males by CAA, both in 2023 and in 2024.

In 2023, delivery through courier lasted around 18-19 hours, except for one instance when the package arrived with a delay of two days. Sterile male mortality reached high rates (51%) early in the season. The rates could be decreased to 22.7% by reducing the mosquito density in the transportation cups and improving adult sugar intake. Mosquito mortality was also decreased by reducing the transportation time to 3 hours by switching from courier transportation to direct transportation of the package via train/car by CAA or SUPSI operators, although this was done only at the end of the season (i.e., in September 2023). In 2024, the same problems with duration of transportation by courier were observed: mortality rose above 43% when courier transportation time exceeded 24 hours (July 2024), while reducing transport time to three hours (by direct transportation via car) lowered the mortality rate to 2.1%.

3.2.2 Quality of males: sterile male residual fertility

In 2023 and 2024, the natural fertility tested in the laboratory with non-irradiated males was on average 96.2%. In 2023, the sterile male residual fertility tested in the laboratory with males irradiated at 40 Gy was on average 0.03%. In 2024, the males to be released were irradiated with a lower dose (i.e., 35 Gy) to increase the survival of released males. Consequently, the residual fertility was also higher (0.3%). According to previous tests, the residual fertility of the released males should be limited according to the population basic offspring number and anyway below 2% to achieve an effective control of *Ae. albopictus* populations in a tropical area using the SIT as part of an integrated pest management approach (Aronna and Dumont 2020). The CAA has observed in release studies in Italy that the use of radiation doses between 30 and 40 Gy effectively induce sterility into the natural population with an acceptable residual fertility lower than 2% (Balestrino et al., 2010; Bellini et al., 2013; Bellini et al., 2021). Therefore, the sterility level of irradiated males that were released in Morcote is considered in line with expectations.

3.2.3 Releases of sterile males

We conducted 34 sterile releases per season with a weekly (May, June, and the second half of Sept) or bi-weekly frequency (July, August, and the first half of Sept). In total, about 3.5 mio sterile males were released per season. The release time took approximately 3 hours with the involvement of two technical operators by car to cover the test area of 45 hectares.

3.2.4 Monitoring of mosquito population: egg abundances and viability

The average egg density in the SIT area was systematically lower than in the control area, both in 2023 and 2024 (**Fig. 8**). Overall, in the SIT area the egg density was reduced by 54.8% throughout the entire activity period of the mosquitoes.

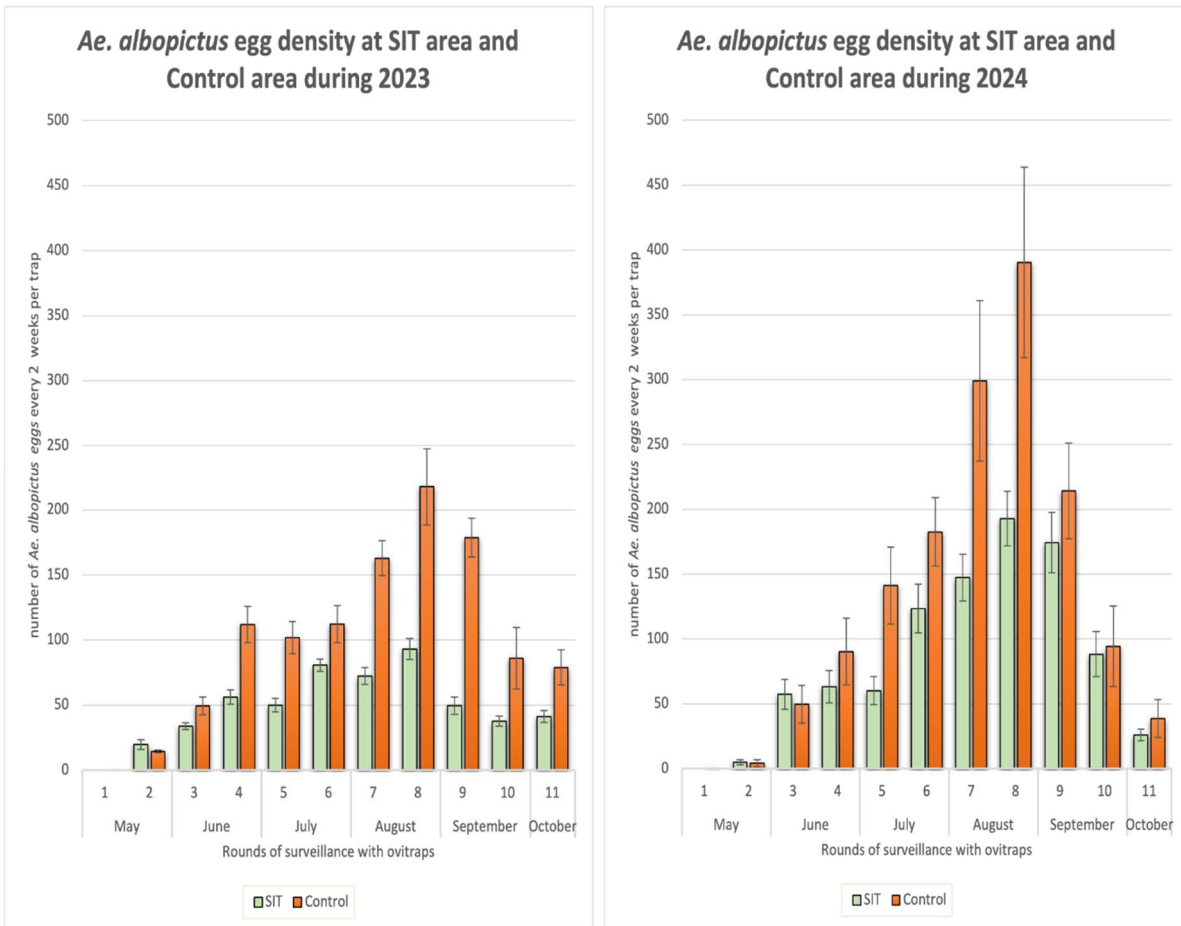


Figure 8. Fortnight average egg density in the SIT area and in the control area in 2023 and 2024.

The induced sterility remained consistent across years but had values lower than expected, around 18% less in the release area. Mean egg hatching in the SIT area was 76.4%, compared to 93.1% in the control area.

3.2.5 Monitoring of mosquito population: adult abundances

The adult traps displayed for the test worked correctly in both areas. The data indicated an overall decrease in the density of adult females throughout the 2023 and 2024 mosquitoes' entire activity period by 64.9%. The seasonal peak was confirmed at the end of August (2023) or beginning of September (2024) and was notably higher in the control area. In the release area, the typical exponential growth in number of females did not occur at all in 2023 and was very light in 2024 (**Fig. 9**).

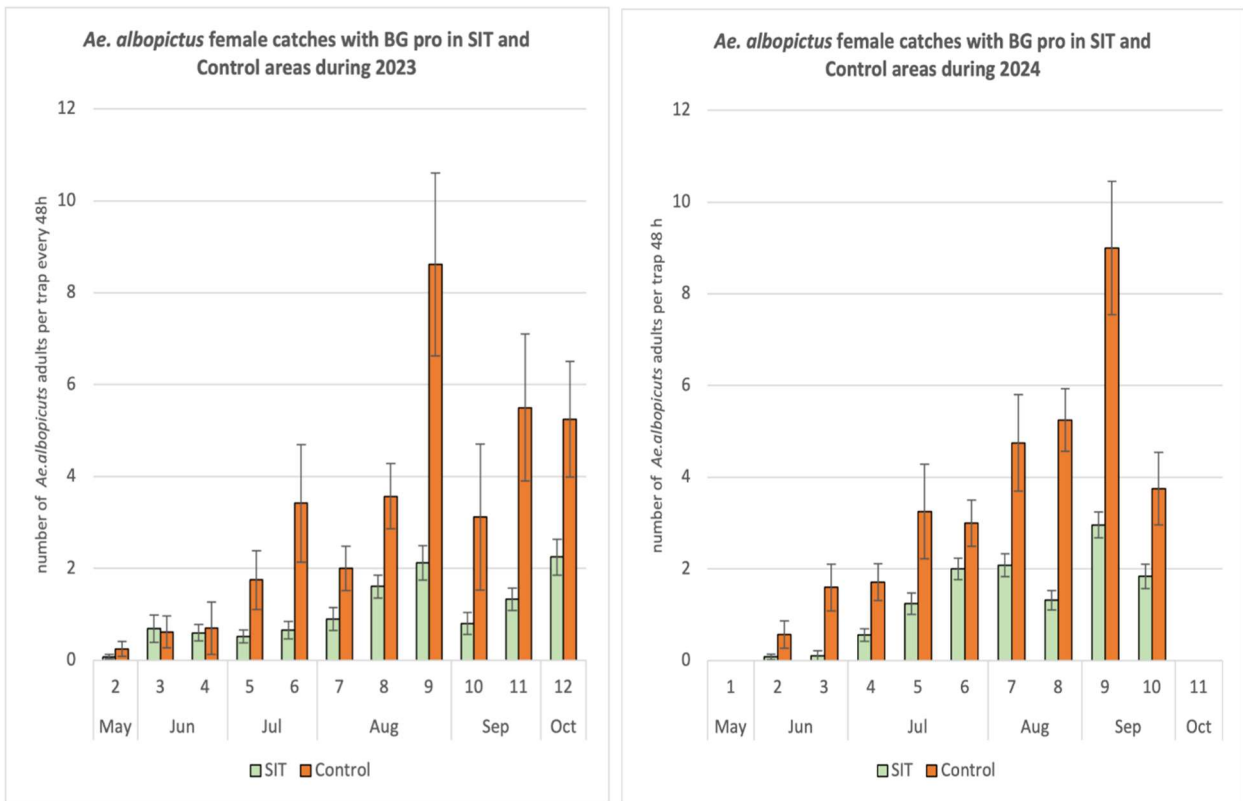
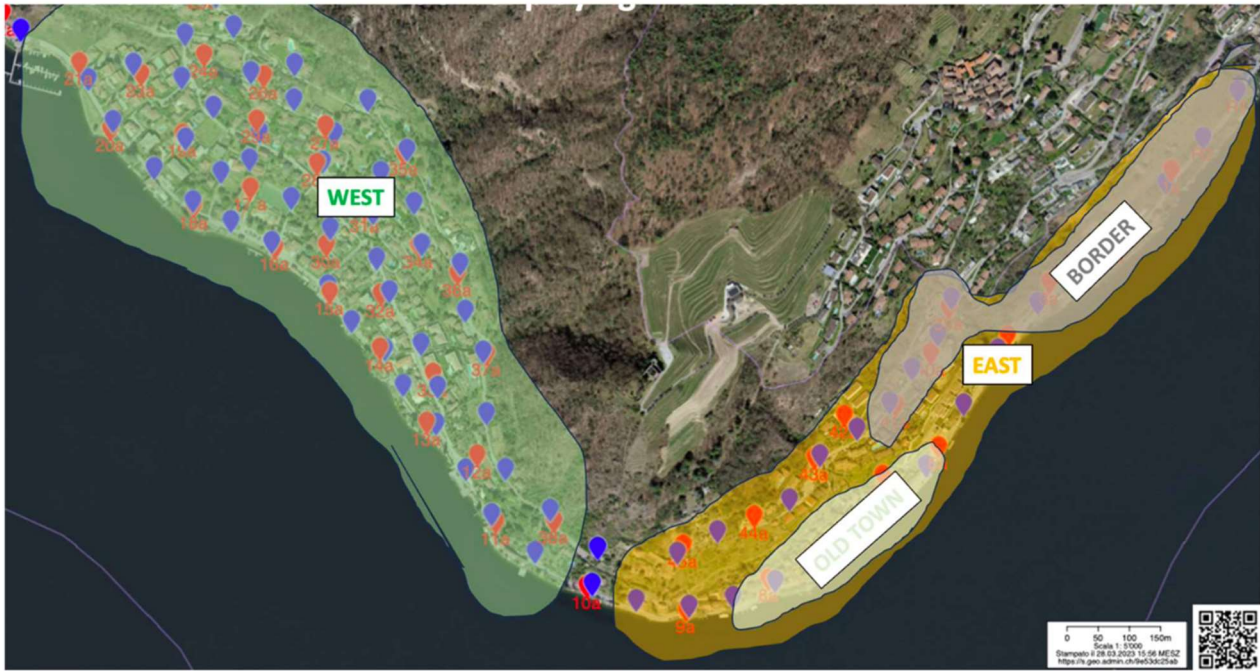


Figure 9. Fortnight average adult female density in the SIT area and in the control area in 2023 and 2024.

3.2.6 Difference between areas in the release municipality

Independent analysis of the areas within the sterile male release zone shows notable differences regarding the reduction of egg number, number of adult females, and induced infertility (**Fig. 10**). The SIT seems to have worked best in the most isolated zone, namely, the western zone. This zone borders only with the lake and the forest and is characterized by homogeneous building of family houses with gardens (mostly secondary dwellings). The second-best SIT area was the old town, where the village core, characterized by stacked old houses, very close together and narrow streets is located. The SIT was less effective in the East area, which is less isolated because it borders the neighboring municipality of Vico Morcote. This area is characterized by different types of construction, single-family houses, multi-family, core, the church and several orchards. This area is very touristic, in fact there are numerous restaurants, stores and parking lots. The Border area is very close to the town hall of Vico Morcote, where no sterile males' releases were performed. Therefore, this area can easily be affected by fertile females' introductions, as reflected by the results.



Area	D (reduction in egg density)		FD (reduction in female density)		S (induced sterility)	
	2023	2024	2023	2024	2023	2024
WEST	73,3	60,7	72,1	68,5	25	20
OLD TOWN	33,4	38,4	82,9	75,4	18	18
EAST	19,2	28,9	64,3	57,0	16	16
BORDER	11,5	17,0	51,1	47,8	15	14

Figure 10. Different areas in the release municipality.

3.2.7 Mark, release, recaptures of sterile males

During 2023, three MRR were performed: 1 at the beginning (13th of June 10,000 males), 1 in the middle (11th of July 20,000 males) and 1 at the end of the season (22nd of August 20,000 males). Among the totally 50,000 sterile males released, 19,835 (39.67%) were not able to fly after one hour from the release. Therefore, we may assume that about 30,165 sterile males were successfully released. In 2023, both mortality and sex of mosquitoes were counted in some cups: among a total of 6,867 dead adults 24 were female, therefore it can be assumed a 0.35% residual presence of female.

In 2024, the rate of sterile male recaptures was 5.44%, higher than 2023 (0.61%), the daily survival rate of sterile males was $SR=0.63$ (0.63 in 2023) while the average life expectancy (ALE) was 2.18 days (3.5 days in 2023; **Tab. 1**). The mean distance travelled by the sterilized males was 69 m (97.3 in 2023) and the maximum distance was 115.8 m (184.4 m in 2023). According to the date we can estimate that 80% of released males covered a surface of 100 m and only 18% could go over this 100 m to 200 m.

Table 1. MRR results in the trial area.

	2023	2024
Average recapture rate of marked males	0.61%	5.44%
Daily survival rate	0.63	0.54
Average life expectancy [days]	3.5	2.18
Average distance travelled [m]	97.3	69
Maximum distance travelled [m]	184.4	115.8

3.2.8 Communication to citizens

As a follow-up to the experiment, there were numerous media coverage events throughout Switzerland (television, radio, newspapers) and internationally (Italy, Germany), public events organized by SUPSI, etc. All of them showed interest in the experiment about the technique and the preliminary results. There were no negative comments. Some municipalities even expected the technique to be integrated into the regular surveillance and control system in the Ticino Canton in 2023.

3.3 Discussion

Thanks to the two seasons of continuous releases, SUPSI has acquired the technical and scientific capabilities to carry out the experiments.

The results are encouraging. An overall decrease in mosquitoes was seen in both eggs (54.8%) and adults (64.9%). The decrease was especially important during the seasonal peak, despite the fact that the induced sterility was low (17.8%). It will be necessary to investigate the reason for this figure, probably due to introductions from the transit of people to the municipality of Morcote, which is very touristy. It is also interesting to see that the data are different according to the area in which they are collected: more isolated residential area, core, border area. In the future, it will be necessary to better investigate the effectiveness as a function of spatial structure.

It was interesting to confirm the data from the ordinary surveillance system and to see that infertile males do not seem to have had an influence on the neighboring municipality of Vico Morcote. The experiment was therefore quite isolated, as we were promised. By means of MRR tests, it was seen that 80% of the sterile males remained within a distance of 100 m and the average survival of these is around 2 to 3.5 days, which justifies biweekly releases and shows the safety of the experiment along with the residual fertility datum of 0.03 to 0.3% of the sterilized males and the presence of 0.35% of released females.

At the beginning of the 2023 season, we had to do numerous trials to reduce the mortality of the sterile males to be released, so we came to the conclusion that by providing an additional meal of sugar in production and decreasing both the densities per cup and the travel time of the pack we

can arrive at an acceptable mortality to carry out the experiment. Transportation of the sterile males by courier remains at this time a point to be improved.

Acceptance by the public in Ticino and elsewhere has been extraordinary. The SIT experiment attracted great interest from the public with more than 70 coverage in the media, and all were supportive of the technique. Citizens organized a fundraiser to support the project, and surveys and public activities consistently showed no criticism. Many municipalities and cantons would already like to apply this technique, but further scientific evidence of effectiveness in different territorial situations is needed as well as a biofactory that can support such a production.

Doing a bit of rough math with the studies already carried out in Canton Ticino, we have shown that the integrated control measures in place allow to decrease the presence of tiger mosquito by 74% (Ravasi et al. 2021) and the estimated cost per citizen is 1.50 francs. To these measures can be added an additional contribution from citizens if they worked individually optimally by 68% (data collected during pandemic years) for a cost per citizen of about 11 francs (the 50g sachet of VectoBac® G). The same is true for volunteer citizen groups in Canton Ticino that take care of their neighborhood with an 'additional 66% effectiveness at the baseline system. Doing door to door can lead to exceptional results, but in places where there are no continuous introductions and over limited areas, such a strategy is unimaginable on a large scale because of the prohibitive cost and difficulty of accessing every home. Thus, the SIT technique has an efficacy, at the moment and in the area where the test took place, comparable to the citizens' contribution by having a cost per citizen (current costs) of 9.50 francs if there is a scientific data analysis facility, while it would cost 4 francs per citizen if only sterile males were to be released. Another advantage of this technique is that it has a different mode of action than the current ones, i.e., one does not have to go looking for breeding sites, which is not always obvious, but it is the mosquitoes that look for mosquitoes all over the territory both public and private.

We plan to expand the trial starting in 2025 over much of the territory considering the following points:

- Improvement of the quality of the males (production, sterilization, packaging and transport).
- Response of the technique with different ground structures
- Cost-benefit analysis (timing and scale of releases)
- Impact on nuisance and risk of disease transmission
- Evaluation of public response to this new technique.

References

- Anicic, N., Steigmiller, K., Renaux, C., Ravasi, D., Tanadini, M., Flacio, E. (2023). Optical recognition of the eggs of four Aedine mosquito species (*Aedes albopictus*, *Ae. geniculatus*, *Ae. japonicus* and *Ae. koreicus*). *PloS One*, 18, 11: e0293568. doi:10.1371/journal.pone.0293568
- Aronna, M. S., and Dumont, Y. (2020). On nonlinear pest/vector control via the Sterile Insect Technique: impact of residual fertility. *Bull. Math. Biol.* 82, 110. doi:10.1007/s11538-020-00790-3
- Balestrino, F., Medici, A., Candini, G., Carrieri, M., Maccagnani, B., Calvitti, M., et al. (2010). γ ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. *J. Med. Entomol.* 47, 581–591. doi:10.1093/jmedent/47.4.581
- Balestrino, F., Puggioli, A., Gilles, J.R.L., Bellini, R. (2014). Validation of a new larval rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mass rearing. *Plos One* 9(3) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091914>.
- Bellini, R., Carrieri, M., Balestrino, F., Puggioli, A., Malfacini, M., and Bouyer, J. (2021). Field competitiveness of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) irradiated males in pilot Sterile Insect Technique trials in northern Italy. *J. Med. Entomol.* 58, 807–813. doi:10.1093/jme/tjaa235
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., and Carrieri, M. (2013). Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *J. Med. Entomol.* 50, 317–325. doi:10.1603/me12048
- Flacio, E., Engeler, L., Tonolla, M., Lüthy, P., Patocchi, N. (2015). Strategies of a thirteen year surveillance programme on *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*) in southern Switzerland. *Parasites & Vectors* 8(1): 208. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0793-6>
- Ravasi, D., Parrondo Monton, D., Tanadini, M., Flacio, E. (2021). Effectiveness of integrated *Aedes albopictus* management in southern Switzerland. *Parasites & Vectors* 14(1): 405. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04903-2>
- <https://www.iaea.org/topics/insect-pest-control/manuals-and-protocols>

Abbreviations

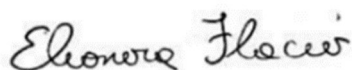
- ALE: Average life expectancy
- CAA: Centre Agriculture and Environment “Giorgio Nicoli”, Crevalcore, Italy
- ECOVET: Vector Ecology Group, SUPSI

SUPSI

FOEN:	Federal Office for the Environment
HLC:	Human Landing Collections
IAEA:	International Atomic Energy Agency
MRR:	Mark release recaptures
SIT:	Sterile Insect Technique
SR:	Survival rate
SUPSI:	University of Applied Sciences and Arts of Southern Switzerland
TDR:	Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases co-sponsored by UNICEF, UNDP, the World Bank and WHO
WHO:	World Health Organization

Acknowledgements

We thank Francesco Pace, Valentina Campana, Nikoleta Anicic, Klaudia Erndle, Pietro Storelli, Sara D'Alessio and Mariantonietta Lettieri (IM, SUPSI) for his great help in the field and in the laboratory work. We are very grateful to Prof. Romeo Bellini and Arianna Puggioli (CAA) for helping us to set up this project and for offering the sterile male adults. We are also very grateful to the municipal authorities of Morcote and Caslano for having allowed the development of this research in their territory and to the municipal workers for having logistically facilitated the fieldwork. We are very grateful to Grupo Tragsa (Spain) for sharing their experience. Florence Fouque (TDR/WHO) and Jérémy Bouyer (IAEA) for their scientific support and for the financial support we thank immensely: the Kantonales Laboratorium of the Canton Basel City, the Swiss Expert Committee for Biosafety, the Office for Nature and Environment of Canton Grisons, the Federal Office for the Environment and ISIDORe.



Dr. Eleonora Flacio

SUPSI – Institute of microbiology, Vector ecology group

Mendrisio, 30.11.2024

SUPSI

Report

Contract no.: **04.1240.PZ / 29DF83B0A**

Reporting Period: **01 September 2024 – 30 November 2024**

Project title: **Funding request for improving data collection and analysis under the sterile male technique project on Aedes albopictus in Canton Ticino**

Project leader: Dr. Eleonora Flacio
Istituto microbiologia (IM)
SUPSI
Via Flora Ruchat-Roncati 15
CH-6850 Mendrisio

TABLE OF CONTENTS

1. General considerations	3
2. Analysis of the SIT data collected in 2023 and 2024	4
2.1 Modelling number of eggs	4
2.1.1 Generalised Additive Mixed-Effects Model (GAMM)	4
2.1.2 Spatial Generalised Additive Model (spatial GAM).....	5
2.2 Modelling percentage of hatched eggs	5
2.2.1 Generalised Additive Mixed-Effects Model (GAMM)	5
2.2.2 Spatial Generalised Additive Model (spatial GAM).....	5
2.3 Modelling number of adults.....	6
2.3.1 Generalised Additive Mixed-Effects Model – Females (GAMM).....	6
2.3.2 Spatial Generalised Additive Model – Females (spatial GAM)	6

SUPSI

2.3.3	Spatial Generalised Additive Model – Males (spatial GAM)	6
3.	Plan for future seasons	6
3.1	Design of the experiment.....	7
3.2	Expected Results.....	9

1. General considerations

Aedes albopictus, also called tiger mosquito, is an invasive allochthonous species that is now established in most of the territory of the Canton of Ticino for almost 20 years and is also recently expanding in other Swiss regions ([Invasive Mosquitoes - Swiss mosquito network \(zanzare-svizzera.ch\)](https://www.zanzare-svizzera.ch)). This species of mosquito is considered one of the most dangerous invasive species in the world, both for its ability to spread and to transmit exotic diseases such as dengue, chikungunya and Zika. This mosquito is also of tremendous nuisance to citizens, who unfortunately may react by applying biocides in an uncontrolled manner, thus causing health and environmental risks. In Canton Ticino *Aedes albopictus* is currently managed with satisfactory results ([Presentazione - ICM \(DSS\) - Repubblica e Cantone Ticino](#); [SUPSI - Istituto microbiologia - Zanzare](#)), through larval control and community participation. However, a limit of effectiveness is thought to have been reached somewhat due to, for instance, the presence, both in public and private spaces, of cryptic and/or non-accessible breeding sites, the lack of control in specific locations (e.g., building sites, secondary houses, and abandoned sites), or the difficulty in consistently keeping the dedication of citizens alive. The remaining mosquito population densities are estimated to be sufficient to cause a potential risk of transmission of exotic diseases. Thus, there is still a need to improve the control methods to overcome these limitations.

The Sterile Insect Technique (SIT) could provide a sustainable solution. The SIT uses irradiation to sterilize male mosquitoes, which are then released in large numbers in target areas to mate with wild females, thus preventing wild female eggs from hatching and leading, over time and successive releases, to a decline in the wild population. Its mode of action is therefore different from traditional control methods that focus on detecting and removing/treating breeding sites. In the SIT, it is the mosquitoes that go looking for mosquitoes, which makes it an interesting method to integrate into the existing control measures. The SIT is considered without any hazards for the public and animal health as well as for the environment.

The Vector ecology (ECOVET) group of the Microbiology Institute of SUPSI considers fundamental to test this technique in Ticino to see whether it could be integrated into the tiger mosquito control measures already in place. In partnership with the Centre Agriculture and Environment “Giorgio Nicoli” (CAA) in Bologna, a European leader in the production of sterile males, we carried out a feasibility study initially supported financially by ECOVET itself, the Kantonales Laboratorium of the Canton Basel City and the ‘Amt für Natur und Umwelt’ of Canton Grisons. Proven the implementation, in 2023 it was possible to launch a pilot study which was in addition financially supported by the Swiss Expert Committee for Biosafety (SECB), the Federal Office for the Environment, the municipality of Morcote and ISIDORE.

The studies are part of a global network of SIT trials taking place simultaneously in various parts of the world under the auspices of the WHO's Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) and the International Atomic Energy Agency (IAEA), who provide scientific and technical support. The plan of action follows the phased conditional approach (PCA) recommended by FAO/IAEA Insect Pest Control Subprogramme, in which advancement to the next phase depends on completion of activities in the previous one.

The results for the 2023 and 2024 pilot trials were very encouraging: an overall decrease in mosquitoes was seen in both eggs (55%) and adults (65%) was observed with the most important decrease during the seasonal peak. This despite the fact that the induced sterility was low (18%). It was also observed that 80% of the sterile males remained within 100 m of their release point, which shows the safety of the experiment, and that their average survival was around 3.5 days, which justifies biweekly releases.

Thanks to recent involvement in these SIT trials of a professional consultant in statistics of the Zurich Data Scientists (ZDS), which already collaborate for other projects with SUPSI, it was possible to realize that many studies with this kind of technique are based on poorly constructed experimental designs, inadequate statistical methods, and misleading assumptions even if used as references by the scientific community. For example, if a significant reduction in mosquitoes in the treated area is observed, compared to the control, the difference could be due to other factors related to the control area not considered yet in the analysis. Instead of comparing the treatment area with the control area, it makes more sense to look at the dynamic of egg density (fertility) in the treatment area, using appropriate models.

With this additional statistician support we want to improve the analysis and representation of the 2023 results, as well as the fine-tuning design of the experiment and analysis in 2024. Furthermore, a plan with adjusted design for the futures seasons is prepared to achieve a comprehensive approach to implement the SIT in Switzerland as an integrated control measure for *Ae. albopictus* populations. Here we present the statistical methods used to analyze the data collected in 2023 and 2024 and the plan with adjusted design for the future seasons.

2. Analysis of the SIT data collected in 2023 and 2024

2.1 Modelling number of eggs

2.1.1 Generalised Additive Mixed-Effects Model (GAMM)

All statistical analyses were conducted using R. We modelled the response variable, "total number of *Ae. albopictus* eggs" (a count variable), using a Generalized Additive Model (GAM) with a negative binomial family to address overdispersion. The model included a smooth effect for "sampling date",

represented as the day of the year (a numeric variable), which interacts with municipality (municipality.fac). municipality.fac is a categorical variable, consisting of two levels: Caslano and Morcote. Its effect was modelled as a fixed effect. We controlled for the non-independence of observations by including trap ID (a categorical variable) as a random effect, with data from the distinct traps. Model complexity was evaluated, and the best-fitting model was selected using a Chi-square test and AIC and BIC criteria. The significance level was set at 5%.

2.1.2 Spatial Generalised Additive Model (spatial GAM)

We fitted two separate models to analyse the response variable, total.albopictus.eggs, using a Generalized Additive Model (GAM) with a negative binomial family to account for overdispersion. One model was fitted for the municipality of Morcote, and the other for Caslano. Both models included a smooth effect for the “sampling date”, represented as day of the year (yday), and a combined smooth effect for geographic coordinates to capture spatial variability within each municipality.

2.2 Modelling percentage of hatched eggs

2.2.1 Generalised Additive Mixed-Effects Model (GAMM)

We modelled the percentage of hatched *Ae. albopictus* eggs (combining the variables hatched.albo.eggs.after.proc and non.hatched.albo.eggs.after.proc to a binomial response variable), using a Generalized Additive Model (GAM) with a quasi binomial family to address overdispersion. The model included a smooth effect for “sampling date”, represented as the day of the year (yday, a numeric variable), which interacts with municipality (municipality.fac). municipality.fac is a categorical variable, consisting of 3 levels: Caslano, Morcote, Vicomorcote; its effect was modelled as a fixed effect. We controlled for the non-independence of observations by including trap ID (unique.ID, a categorical variable) as a random effect, with data from 62 distinct traps. Model complexity was evaluated, and the best-fitting model was selected using a Chi-square test and AIC and BIC criteria. The significance level was set at 5%.

2.2.2 Spatial Generalised Additive Model (spatial GAM)

We fitted two separate models to analyse the percentage of hatched *Ae. albopictus* eggs (combining the variables hatched.albo.eggs.after.proc and non.hatched.albo.eggs.after.proc to a binomial response variable), using a Generalized Additive Model (GAM) with a quasi binomial family to account for overdispersion. One model was fitted for the municipalities of Morcote and Vico Morcote, and the other for Caslano. Both models included a smooth effect for the “sampling date”, represented as day of the year (yday), and a combined smooth effect for geographic coordinates to capture spatial variability within each municipality. We selected the best-fitting models by evaluating AIC and BIC criteria. The significance level was set at 5%.

2.3 Modelling number of adults

2.3.1 Generalised Additive Mixed-Effects Model – Females (GAMM)

We modelled the response variable, “number of *Ae. albopictus* females” (*Ae.albopictus.female*, a count variable), using a Generalized Additive Model (GAM) with a negative binomial family to address overdispersion. The model includes a smooth effect for sampling date, represented as the day of the year (*yday*), a numeric variable, which interacts with municipality (*municipality.fac*). The municipality variable consists of 2 levels (Caslano, Morcote), and its effect was modelled as a fixed effect. We further controlled for the non-independence of observations by including trap ID (*ID_BG_trap.fac*) as a random effect, with data from 33 distinct traps. Model complexity was evaluated, and the best-fitting model was selected using AIC and BIC criteria.

2.3.2 Spatial Generalised Additive Model – Females (spatial GAM)

We fitted two separate models to analyse the response variable, “number of *Ae. albopictus* females” (*Ae.albopictus.female*, a count variable ranging from 0 to 20), using Generalized Additive Models (GAM) with a negative binomial family to account for overdispersion. One model was fitted for the municipality of Morcote, and the other for Caslano. Both models included a smooth effect for the sampling date, represented as day of the year (*yday*), and a combined smooth effect for geographic coordinates to capture spatial variability within each municipality. This allowed us to assess the temporal trends and spatial distribution of egg counts separately for Morcote and Caslano. We selected the best-fitting models by evaluating AIC and BIC criteria.

2.3.3 Spatial Generalised Additive Model – Males (spatial GAM)

The same model as for section Spatial Generalised Additive Model – Females (spatial GAM) was fitted, only for males.

3. Plan for future seasons

The objective is to update the methods used to test the efficacy of SIT, from the design of the experiments to the data collection and analysis. Using Ticino as a testing field, we want to advance various aspects of SIT implementation and research in the field. The comprehensive new protocol design will be used to understand the main factors affecting the success of SIT in typical *Ae. albopictus* habitats to assess whether where and how the application of this technique is of interest (costs/benefits). Consideration will also be given to whether SIT can lower the risk of disease transmission.

3.1 Design of the experiment

The SIT field study should be run over three years (for instance, 2025, 2026 and 2027) during the mosquito active season, from May to October. The study is to be carried out in 21 sites distributed in the four districts of Ticino (i.e., Mendrisio, Lugano, Bellinzona and Locarno) with highest densities of *Ae. albopictus*. The sites cover several types of habitats typically related to *Ae. albopictus* infestation in Ticino such as urban city centre, village core, residential area, campsite, hotel and surrounding. Each site has a central area of approximately 12 ha (**Fig. 1**). The central area is represented as a circle with a radius of 200 m based on the maximal distance travelled by *Ae. albopictus*. The measure of 100-200 m of autonomous tiger mosquito displacement is the one adopted by the European systems of Italy, France, Spain and Switzerland in the case of adulticidal intervention against the mosquito in case of arbovirus introduction. The size of the area helps to ensure absence of mosquito's natural entry all the way to the center of the experiment. In SIT treated sites (**Fig. 1**, red circle), sterile males are released two times per week over the whole area by means of 18 evenly distributed release stations (red dots in the red circle). Egg density and fertility are assessed both in SIT and control sites every two weeks by means of ovitraps (1 ovitrap/ha; blue dots). Adult density and sex ratio are assessed with the same frequency by means of adult traps (green dots) distributed over a transect. The border effects of SIT are assessed by collecting egg and adult data in a randomly selected border area (the green sector) of 12 ha (extending approx. 300 m from the border of the central area).

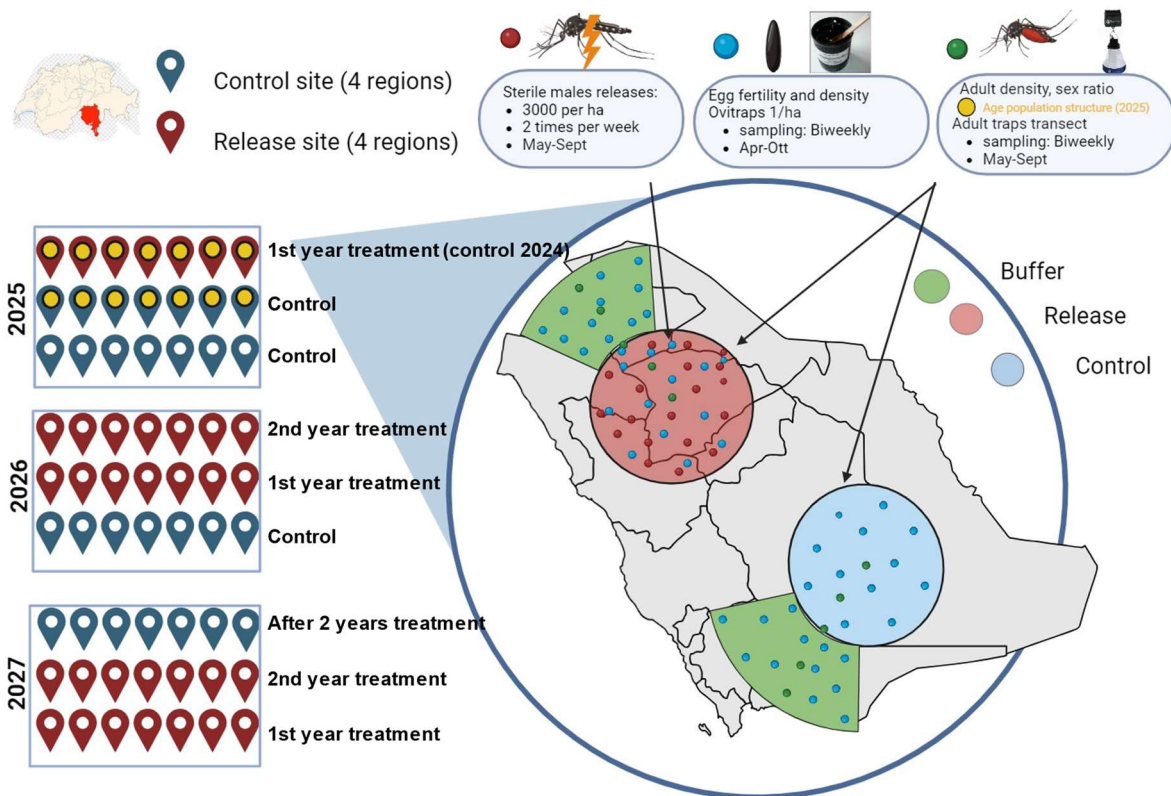


Figure 1. Experimental design. Image created with BioRender.com.

The sites enter the SIT treatment progressively (**Fig. 1**, on the left). In 2025, seven sites are treated while 14 sites act as a control. In 2026, seven of the sites that were used as control in 2025 are treated bringing the total number of treated sites to 14. In 2027, the seven sites used as control in 2025 and 2026 are treated, while the seven sites treated in 2025 and 2026 are not treated but still monitored. The idea of the design is that each site is firstly available as control and then as treated. For the seven sites that are treated in 2025, the first year of the study, control data are being collected in 2024. This implies that each site can act as its own control. This is relevant as we know from other studies in Ticino that the variability among sites and among ovitraps, used to measure the density of eggs in one site, can be important. Another advantage of this design is that it enables us to disentangle the effect of “calendar year” (2025, 2026 and 2027) from the effect of “year of treatment” (i.e. first and second). Indeed, if we were to follow a different design treating say half of the sites in 2025 and keeping them treated in 2026 it would be difficult to know whether a very good effect in 2026, the second year of treatment, is due to an adverse year for tiger mosquitos and thus the treatment is more effective or whether in the second year of treatment the effect is truly very strong. So, this design also enables us to better assess what the year-to-year variation actually is. Lastly, seven sites are treated in 2025 and 2026, but not in 2027, allowing us to observe what happens when a site is not treated after two consecutive years of treatment.

Fixed elements of the design

The frequency of treatment (two times per week) is held constant, as well as the density of the releases (3,000 sterile males per ha per week; suitable dose estimated based on the local mosquito population density; a ratio between sterile to wild males in the range of 5:1 to 10:1 must be maintained along the season to see a substantial impact). This is required to keep the design simple and feasible. The frequency of data sampling (every two weeks) is consistent with the surveillance system currently in place and has been proven to be adequate for modelling.

Non-fixed, but potentially controlled elements of the design

The sterile male quality may vary over time and is expected to improve during the study. Due to the sequential nature of the design, the male quality would not interfere in the estimation of the “year of treatment effect”, but rather with “calendar year” effect. This is good, as we want to best estimate the “year of treatment effect” while “calendar year” is rather a variable we want to control for. Note, however, that sterile male quality could be quantified over time (i.e. with flying, survival or mating tests) and this information may be incorporated in the analyses.

Border effects and minimal treatment size

A very important element of the design is that in each site there will be some ovitraps placed in a border area (the green sector in **Fig. 1**) outside the treated area. These ovitraps are essential to estimate how the effectiveness of the treatment drops when going further away from the treated area. In practice, we will define a polygon of the treated area, and use this to estimate the distance to

treated area from the treated area for each ovitrap laying outside the treated area. We expect the effect of the treatment to drop the further away from the treated area it is. The drop of effectiveness will be estimated as a smooth function of “distance to treated area”. One may say that border effects are rather inwards effects where at the border although an ovitrap is in a treated area show less reduction than in the centre of the treated area. This is why this analysis will also be conducted inwards, meaning that “distance from border of treated area can also take negative values”. Greater negative values here imply being closer to the centre of the treated area. This analysis may also provide us with information about what is the minimal area size that can be treated. This analysis can be extended to exploratively test whether these distances to border have the same effects in different landscapes. The total area treated may have an effect on the border effects themselves. It may occur that being at 20 m of a small, treated area border is very different from being at 20 m of a large, treated area. These effects can also be assessed.

3.2 Expected Results

Strong and robust results: The proposed design allows us to estimate well the effect of “calendar year” and “year of treatment”. As mentioned above, there will be more observations for the “first year of treatment” and the estimate of the effect will be more precise and robust than for the “second” year. However, the sample size is more than enough to estimate these parameters. In addition, this design allows us to estimate the variation among year of the treatment effects. So, we may be able to say something like “The first year of treatment effect was -10% in 2025, -15% in 2026 and -8% in 2027. So, there are non-negligible differences among years”. Furthermore, we will also be able to quantify to what extent these effects vary across sites. So, we may be able to say something like “On average the first year of treatment effect is -15%, however, variability among sites is large. Some sites showed as -1% while other showed extremes of -70% in the first year”.

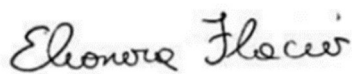
Feasible analyses: One may want to address the question whether the treatment effect is constant within a given year. “So, is this -15 % true from May to September?”. By extending the initial model with e.g. some smoothers, we can investigate the question whether the effect changes within a given year. These analyses are weak in the periods where there are little eggs or adults, that is, at the beginning and at the end of the season. These analyses may nevertheless be used to generate hypotheses on whether the frequency of treatment should be changed within a season. So, useful information for a potential follow-up study.

The distance to border or centroid analyses are expected to provide with insights on the spatial effectiveness of the treatment as well as with hints on the minimal size to be treated. Given the large variability within sites, it is not clear to what extent these results will be clear and robust.

Exploratory analyses: With exploratory analyses, one can ask whether the landscape has a great influence on the effectiveness of the treatment. This is particularly relevant to be able to provide

SUPSI

targeted recommendations to municipalities. To inspect landscape effects, we will use the geographic information (e.g., land cover information). One interesting advantage of these analyses is that land cover is available for the whole Switzerland territory, meaning that municipality-level predictions could be done. These analyses are to consider rather exploratory as i) it is not clear which elements play a role, ii) at what spatial level and iii) the design is not maximised to inspect this aspect. Alternatively, we could also run a “crude” analysis where landscape is classified in a few classes (e.g., urban, peri-urban and village core). The distance to border or centroid analyses should also provide us with information on whether landscape can heavily influence border effects.



Dr. Eleonora Flacio

SUPSI – Institute of microbiology, Vector ecology group

Mendrisio, 27.11.2024

COMMENTARY

Open Access



Current status of the sterile insect technique for the suppression of mosquito populations on a global scale

Jérémy Bouyer^{1,2,3*}

Abstract

Background The World Health Organization (WHO) has emphasized the urgent need for alternative strategies to chemical insecticides for controlling mosquito populations, particularly the invasive *Aedes* species, which are known vectors of arboviruses. Among these alternative approaches, the sterile insect technique (SIT) is experiencing rapid development, with numerous pilot trials being conducted worldwide.

Main text This review aims to elucidate the principles of SIT and highlight the significant recent advancements that have facilitated its scalability. I also employ a phased conditional approach to categorize the progression of 39 projects, drawing on peer reviewed studies, press releases and direct communication with project managers. This review indicates that a substantial number of projects illustrate the efficacy of SIT in suppressing *Aedes* populations, with one project even demonstrating a reduction in dengue incidence. I offer several recommendations to mitigate potential failures and address the challenges of compensation and overcompensation when implementing SIT field trials. Furthermore, I examine the potential implications of male mating harassment on the effectiveness of SIT in reducing disease transmission.

Conclusions This comprehensive assessment underscores the promise of SIT as a viable strategy for mosquito control. The insights gained from these trials not only contribute to the understanding of SIT's effectiveness but also highlight the importance of careful project management and ecological considerations in the pursuit of public health objectives.

Keywords Irradiation, Autocidal control, Vector control, Integrated vector management, Integrated pest management, Dengue, Arbovirus, *Aedes*

Background

Vector-borne diseases represent a significant global health challenge, accounting for 17% of all infectious diseases and resulting in more than one million deaths annually, as reported by the World Health Organization (WHO) [1]. Among these diseases, malaria, transmitted by *Anopheles* mosquitoes and diseases caused by arboviruses such as dengue, chikungunya, yellow fever and Zika, transmitted by *Aedes* mosquitoes, are of particular concern. Growing awareness about the toxicity of chemical insecticides to both living organisms and ecosystems has prompted many countries to limit the number of

*Correspondence:

Jérémy Bouyer
bouyer@cirad.fr

¹ Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Centre of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, IAEA, Vienna, Austria

² ASTRE, CIRAD, 34398 Montpellier, France

³ ASTRE, Cirad, INRAE, Univ. Montpellier, Plateforme Technologique CYROI, Sainte-Clotilde, La Réunion, France



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

approved molecules. Moreover, the increasing resistance to pyrethroids—the most commonly used class of insecticides—poses a looming risk of their potential withdrawal in the near future. In response to these challenges, the WHO has advocated for the development of alternative vector control methods targeting mosquitoes [1].

In recent years, genetic control technologies have gained traction globally as viable alternatives to chemical insecticides, acknowledging their detrimental effects on ecosystems and human health. Notably, the sterile insect technique (SIT) has experienced renewed interest as a method for controlling *Aedes* mosquitoes [2], particularly following the Zika virus outbreaks in the Americas and the rising incidence of dengue fever. The WHO and the International Atomic Energy Agency (IAEA) have provided guidelines for testing SIT against *Aedes* mosquitoes [3], which serve as the foundation for upcoming trials in the Pacific region. This raises a pertinent question: what is the status of other ongoing trials worldwide?

New developments in the SIT approach against *Aedes* mosquitoes

The SIT operates on the principle of releasing irradiated sterile male mosquitoes into a designated area, where they mate with wild females, resulting in the production of no viable offspring (Fig. 1). This species-specific, environmentally friendly autocidal method has a long history of successful large-scale implementation against various insect pests since the 1950s, and it is exempt from genetically modified organism (GMO) regulations [4]. In this paper, I did not consider other ways to sterilize the males like chemical treatment, even if a very successful project

was recently reported [5]. Also, several other technologies with similar principles of action are not considered here. These include:

- The incompatible insect technique (IIT), where the induced sterility is conditional to the status of the target population and that can lead to resistance [6];
- The RIDL (release of insects carrying a dominant lethal gene) where the released males are not sterile but result in non-viable or male-biased progeny [7];
- PgSIT (precision guided sterile males), which is based on the crossing of two transgenic lines to produce sterile males and has not been tested in the field yet [8];
- Gene drive, which may allow in the future to drive maleness in target populations but which has also not been tested in the field yet [9].

Mutations resulting from exposure to radiation are inherently random, they are different in each released insect. This randomness inherently limits the potential for the target population to develop resistance, which stands as one of the key advantages of this technology. Furthermore, SIT can be integrated with IIT. In this combination, complete male sterility is induced by *Wolbachia* (which causes cytoplasmic incompatibility) and is conditional upon mating with wild females, while the sterility of residual females is induced by radiation [10]. By sterilizing females released accidentally, the risk of unintended population replacement—often observed when IIT is employed alone—is mitigated. Additionally, the reduced irradiation dose enhances the competitiveness

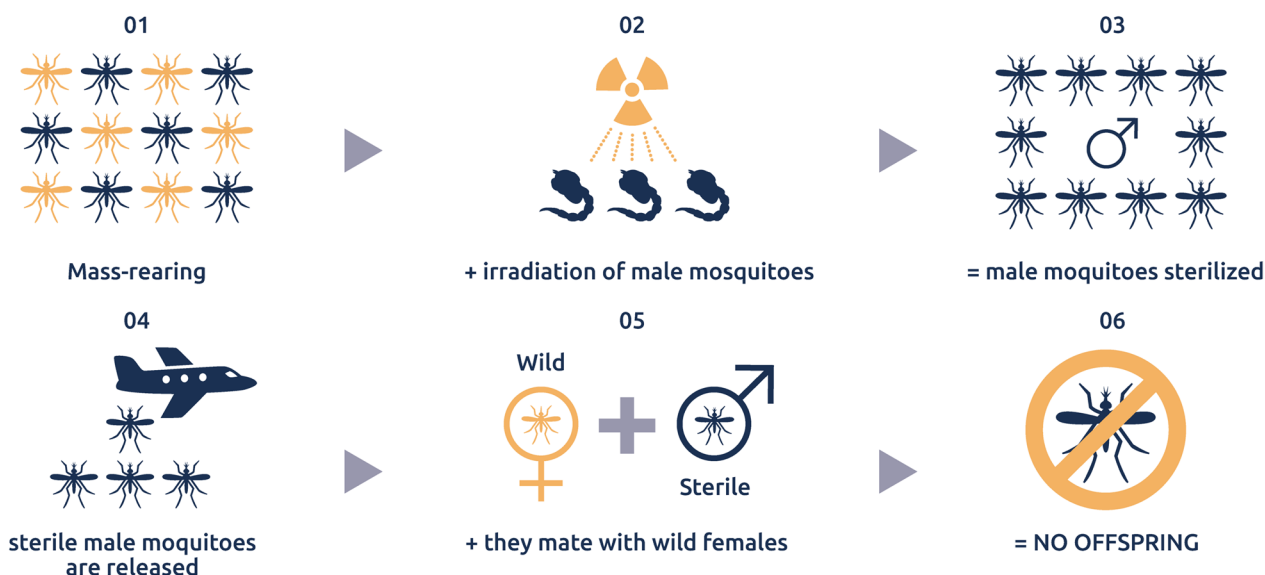


Fig. 1 Principle of the sterile insect technique against mosquitoes (Source: [3])

of sterile males. Another innovative variant, known as boosted SIT, utilizes sterile males not only to induce sterility but also to serve as carriers of biocides targeted at females and their larval habitats [11]. This approach can be particularly effective at the onset of a suppression effort, followed of standard SIT. Its efficiency has recently been demonstrated at a small scale using pyriproxyfen as a biocide in both France and Spain [12]. Pyriproxyfen is a larvicide preventing the metamorphosis of larvae and nymphae into adults, which has previously been used in auto-dissemination stations against *Aedes* species [13].

- The SIT framework for combating mosquito populations encompasses several critical components: strain development, mass rearing, sex separation, sterilization, quality control, handling, transportation and the release of the sterile males. Recent advancements in this area include: The development of more affordable larval diets utilizing insect proteins [14];
- Enhanced feeding protocols along with cost-effective mass-rearing racks and adult cages [15, 16];
- The introduction of automatic sex-sorters that improve the speed of sex separation by up to 17 times compared to traditional manual Fay-Morlan sorters [17];
- Greater understanding of the factors influencing the quality of sterile males when applying pupae irradiation [18], along with the establishment of mass-irradiation protocols for adult mosquitoes [19];
- Standardization of a flight test device that facilitates rapid quality control of sterile males [20], as well as guidelines for assessing their performance in the field through mark-release-recapture (MRR) experiments;
- Development of handling and transportation protocols for chilled adult mosquitoes [21];

Implementation of aerial release systems for sterile male mosquitoes using drones [22]. Recent advancements have contributed to a reduction in the production costs of sterile male mosquitoes, although a perfect genetic sexing system remains unavailable. Ongoing efforts are focused on developing such systems [23, 24] and may allow a further drastic reduction of the cost of SIT against mosquitoes in the near future.

The phase conditional approach to testing SIT against *Aedes* mosquitoes

The evaluation of SIT as a new control tool will ultimately rely on the phase conditional approach (PCA) proposed by the WHO Vector Control Advisory group (VCAG) [3]. However, a more tailored guideline [25] for mosquito SIT has been introduced, motivated by two primary factors (see Fig. 2 of [26]). First, SIT cannot

function as a standalone solution; it must be integrated with other control methods due to its inverse density-dependent properties, which differ from most products evaluated by VCAG. Second, for SIT to be effective, it needs to be implemented area-wide, leading to specific testing requirements that draw from lessons learned in the operational deployment against other pest species, particularly fruit flies and tsetse flies.

The proposed PCA for mosquito SIT serves as a valuable resource for decision makers and research teams in preparing and executing SIT strategies against mosquitoes [25]. Progression to the next phase is contingent upon the completion of most activities in the preceding phase, effectively minimizing the risk of financial losses, as each subsequent phase can incur costs up to ten times greater than its predecessor. It is essential to identify relevant and committed stakeholders for each phase, ensuring they are well informed and adequately trained throughout the decision-making process. Capacity building and expertise tailored to each phase is crucial for developing the technical skills. Additionally, external review meetings with international experts should be convened at the conclusion of each phase to provide recommendations on whether to proceed to the next phase.

During phase 0 (pre-intervention), it is essential to secure governmental commitment to introduce SIT in its integrated vector control strategy (IVM) must be confirmed. This includes not only political backing but also financial support to ensure the program's sustainability. A comprehensive program for mosquito control should be established, featuring dedicated personnel who are adequately trained and equipped, along with a designated budget. Additionally, there should be an overarching national or regional strategy that focuses on integrated mosquito control.

This may be evaluated through the framework for a national vector control needs assessment proposed by the WHO [1]. This framework has been tailored to encompass specific details pertinent to SIT, such as the availability of irradiation facilities. At this stage, it is also crucial to gather all existing entomological and epidemiological data on mosquito-borne diseases from national or regional monitoring systems.

During phase I (baseline data collection), training in mosquito taxonomy, field data collection, data storage and analysis, and field monitoring must be provided. Identifying suitable field sites for future testing is also crucial, as the initiation of a baseline data collection. This data should encompass entomological aspects, including the spatio-temporal characterization of the wild populations, as well as epidemiological, socio-economic and environmental data. Establishing an insectary is essential, where a local mosquito strain can be colonized. Routine

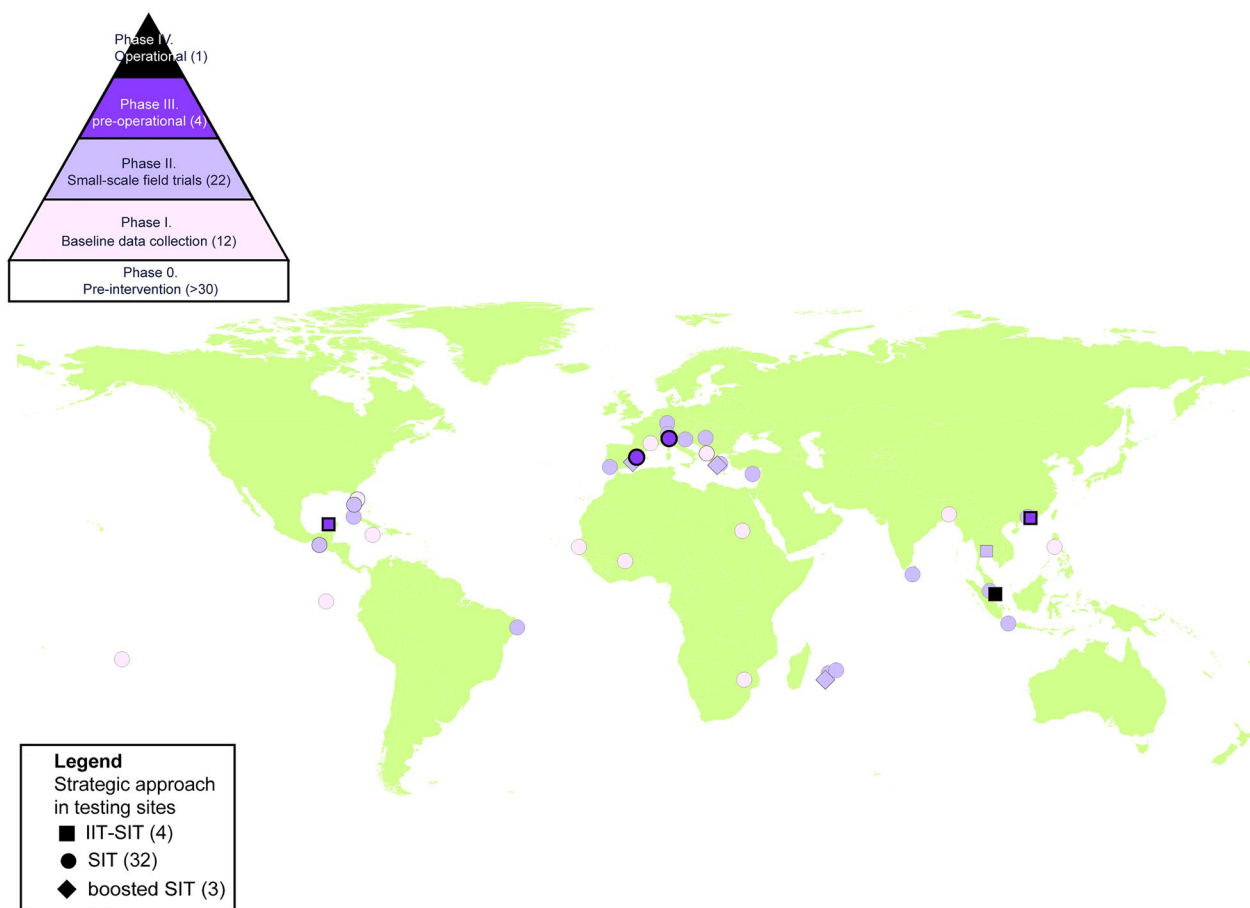


Fig. 2 Global distribution of 39 projects releasing irradiated sterile males. *IIT* incompatible insect technique; *SIT* sterile insect technique. Source of the world map: world administrative boundaries from opendatasoft

colony rearing and maintenance these colonies must be implemented, alongside studies to characterize life history traits, compatibility assessments and semi-field competitiveness studies. Securing irradiation capacity is another vital step, which includes ensuring access to an irradiator, implementing dosimetry, and gathering dose-response information relevant to the strain and irradiator being utilized. It is also important to train staff on standard operating procedures for various laboratory processes, including rearing, sex separation, irradiation, handling, marking, transportation and releasing of sterile male mosquitoes. Finally, a MRR should be conducted to evaluate the survival, dispersal and field competitiveness of sterile males in open field conditions.

During phase II (small-scale field trials), it is essential to develop a comprehensive communication plan aimed at gaining the support of beneficiary communities. Identifying and testing complementary suppression methods to be integrated alongside SIT within an integrated vector management framework is crucial. All necessary authorizations for the release of sterile males must be

secured, including import permits if the production of sterile males is outsourced. If deemed necessary, a risk assessment analysis will be conducted at this stage. The execution of a small-scale field trial is vital, encompassing the entire process from rearing to the monitoring of entomological and potentially epidemiological indicators. This will necessitate an adequate colony size or the outsourcing of sterile male production. The results obtained from this field trial should be disseminated, and a cost-benefit analysis for a potential operational program should be initiated.

Phase III (pre-operational), often regarded as the most challenging step, is initiated only if the country opts to incorporate SIT to its large-scale integrated vector control strategy. At this juncture, a mass-rearing and mass-sterilization capacity will be established, coupled with intensified community outreach initiatives in targeted areas, expanding upon the efforts made in phase II. During this phase, comprehensive strategies for storage, handling, transport, release and monitoring strategies for upscaled application will be developed to support the

upscaling of operations. Ongoing quality control measured will be implemented to ensure the integrity of the process. Additionally, a management plan and structure will be put in place to facilitate the operational application of SIT. The data generated from these larger-scale operations will be utilized to evaluate the cost-efficiency of the technology and to inform the development of a market model.

In phase IV, a large-scale SIT operational program will be implemented, from mass-rearing to aerial releases under an adaptive management framework. Monitoring activities will be conducted in targeted areas, albeit with a lower resolution to enable costs savings. Feedback mechanisms will be established between field, mass-rearing facilities and management teams to enhance communication and efficiency. Continuous analysis of field results, along with the assessment of the impact of releases on entomological and epidemiological indicators, will be undertaken. This ongoing evaluation will inform strategies for improving the efficiency and cost-effectiveness of the IPM strategy, which includes the SIT component. Problem-solving research and routine external reviews will be integral to this process, ensuring that the program remains responsive to emerging challenges and opportunities.

Current SIT projects targeting mosquitoes on a global scale

I used the PCA presented above to categorize the stage of 39 ongoing projects in 2024 (Fig. 2, Suppl. Table 1). Most of these initiatives focus on *Aedes* species, with 18 projects specifically targeting *Ae. albopictus*, 18 aimed at *Ae. aegypti* and 1 addressing both species. In contrast, only two projects are directed towards *Anopheles arabiensis*.

A significant number of projects that were previously in phase I have either ceased operations, failed to provide updates, or progressed to phase II, resulting in the initiation of 11 new projects. Notably, only three projects have advanced to phase III: the IIT-SIT initiative in Mexico, and SIT programs in Spain and Italy. Additionally, one project has reached phase IV, specifically the IIT-SIT project in Singapore (Table 1). Several ongoing phase II projects, including those in Brazil, France, Greece, and Serbia are actively seeking funding to facilitate their transition to phase III. The stakeholders involved in these projects comprise a mix of government agencies, research groups or private companies. The notable growth of SIT trials in Europe is particularly striking, given their primary objective of preventing outbreaks of arboviruses that are not typically endemic to the region.

The commercialisation of sterile male insects by Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli” (CAA), an IAEA collaborating centre in Italy, alongside the

Table 1 Dynamics of sterile insect technique projects against mosquitoes along the phase conditional approach

Phase	I	II	III	IV	Total
2019	21	11	2	0	34
2024	12	22	4	1	39
Increase rate	-43%	100%	50%	100%	NA

NA not applicable

The countries presented in 2019 and 2024 are not identical: no updated data were available for some of them whereas new countries initiated trials during this period

establishment of mass transportation protocols, has enabled the execution of MRR experiments and phase II pilot trials across several European countries, including Albania, Croatia, France, Greece, Montenegro, Portugal, and Serbia. This regional production initiative has significantly bolstered the development of SIT in Europe through two IAEA Technical Cooperation regional projects (RER5022 and RER5026). In some instances, countries such as Croatia and Serbia opted to utilize the Italian strain of *Ae. albopictus* instead of their own local strains; however, most countries requested CAA to mass-rear their local strains. In Cyprus, sterile male *Ae. aegypti* were produced by the FAO-IAEA Insect Pest Control Laboratory in Austria in response to a new invasion of the island by this species. This initiative marks the first effort aimed at the elimination of the target population (Suppl. Table 1). For the phase II pilot trials, the average size of the target areas was 38 hectares, although there was considerable variation, ranging from 1.2 to 230 hectares. The average release density was approximately 15,000 sterile males per hectare per week, with significant fluctuations observed. The release density varied from as few as 353 sterile males per hectare per week in the boosted SIT project on Reunion Island to as high as 166,666 sterile males per hectare per week in the IIT-SIT project in Guangzhou. It is important to note that there was no direct correlation between release density and suppression rates, which ranged from 0 to 100% (see details in Suppl. Table 1). A significant characteristic of successful projects is their ability to garner public support, which is essential for the seamless progression of SIT projects. This support has largely been attributed to well-structured communication strategies that effectively engage diverse audiences. Additionally, the minimal presence of substantial ethical concerns related to this technology has contributed to its widespread acceptance across various cultural contexts. This combination of effective communication and cultural receptivity played a pivotal role in advancing SIT initiatives.

Conclusions

The ongoing evaluation of SIT projects indicates that the effectiveness of SIT against mosquitoes is contingent upon adherence to specific testing and operational conditions [3]. Notably, Singapore's project, which has progressed to phase IV, serves as a model due to its comprehensive approach. This initiative has successfully implemented a PCA, demonstrated significant entomological [27] and epidemiological impacts [28], and showcased cost-efficiency [29], all while maintaining robust public communication to garner support. Consequently, the integration of the IIT-SIT into Singapore's national dengue control strategy, as managed by the National Environment Agency, presents a valuable reference for other nations in earlier phases, potentially expediting their SIT development efforts. It must be noted that this project is an IIT-SIT combination, not a standard SIT one. The logic behind combining *Wolbachia*-induced sterility with SIT lies in minimizing radiation exposure, thereby preserving a good competitiveness of sterile males. However, most of the suppression effect can be attributed to SIT [30] and advancements in mass-irradiation protocols for adult mosquitoes may enable countries engaged in standard SIT to achieve similar or even superior competitiveness [31]. Currently, most countries are still using pupae irradiation, with the exceptions of Brazil, China and Spain. This improvement is crucial, as previous quality losses were primarily linked to anoxia resulting from high density pupae irradiation [32, 33]. The relatively lower transition of countries from phase II to phase III can be attributed to the substantial increase of costs and the necessity for investments in local production capacity. Mass-production in phase III can pose significant challenges; factors that were manageable at smaller scales, such as producing 100,000–200,000 sterile males weekly, can become bottlenecks when production scales exceed one million sterile males weekly. One major cost reduction might come from the development of a fully operational genetic sexing strain [23].

When embarking on mosquito SIT trials, it is essential for countries to identify complementary suppression methods to initially reduce mosquito populations. For instance, public education aimed at reducing larval habitats can be beneficial. Moreover, pilot tests should be conducted in isolated areas or include a buffer of at least 200 m with release of sterile males to reduce the immigration of fertile females from surrounding areas. Target areas should ideally cover a minimum of 50 hectares. In scenarios where induced sterility is at or below 50%, minimal effects on the target mosquito

populations may be observed, often due to the existence of compensation and overcompensation in larval mortality [34].

This remarkable resilience observed in *Aedes* mosquitoes prompts specific recommendations for the implementation of SIT: (i) competitiveness must be assessed in the field and should exceed 0.2 prior to initiating suppression trial; (ii) the release density must be sufficient to achieve an induced sterility rate of at least 0.7 to prevent density-dependant compensation. An alternative approach is to utilize boosted SIT with pyriproxyfen [11] at the commencement of SIT trials to achieve an initial reduction, as this biocide aids in preventing compensation and offers partial protection against the immigration of fertile females. In some trials, an unexpected reverse phenomenon has been noted, where the reduction rate surpasses induced sterility, a situation typically deemed unlikely under standard SIT mechanisms (which rely on egg and early larval mortality). This occurrence was particularly pronounced in China, where a 40% suppression of female mosquitoes, coupled with an 80% decrease in biting rates, was recorded despite minimal induced sterility. This effect was attributed to reduced female survival and feeding success due to male mating harassment [35]. Given that increased female mortality and decreased host-vector contact can immediately lower disease transmission, it will be crucial in future SIT trials to monitor key entomological indicators, including female age, biting rates, in addition to their overall density, alongside egg counts.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40249-024-01242-z>.

Additional file 1 (DOCX 44 kb)

Acknowledgements

I would like to thank Pr. Aleksandra Cupina, Dr. Antonios Michaelakis, Dr. Assane Gueye Fall, Dr. Diana Iyaloo, Dr. Dongjing Zhang, Dr. Eleonora Flacio, Dr. Ignacio Pla Mora, Pr. Dusan Petric, Dr. Givemore Munhenga, Dr. Goran Vignjević, Dr. Hervé Bossin, Dr. Hugo Osório, Dr. Jair Virginio, Dr. Louis C. Gouagna, Pr. Menaka D. Hapugoda, Dr. Roch Dabiré, Dr. Romeo Bellini, Dr. Thierno Bakhoum and Pr. Zhiyong Xi for sharing updates on their respective SIT projects.

Author contributions

Not applicable (JB is the sole author).

Funding

This work was funded by regular budget contributions of the IAEA/FAO member states to the Insect Pest Control Subprogram and JB is currently funded by Région Réunion through the OPTIS project (European Regional Development Fund). The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

Availability of data and materials

All data used in this review are presented in Supplementary Table 1.

Declarations

Ethical approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The author declares no competing interests.

Received: 28 June 2024 Accepted: 12 September 2024

Published online: 26 September 2024

References

- WHO, UNICEF: Global vector control response 2017–2030; 2017.
- Lees RS, Carvalho DO, Bouyer J. Potential impact of integrating the sterile insect technique into the fight against disease-transmitting mosquitoes. In: *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. 2nd ed. Dyck AV, Hendrichs J, Robinson AS. Vienna: CRC Press; 2021: 1082–1118.
- WHO, IAEA. Guidance Framework for Testing the Sterile Insect Technique as a Vector Control Tool against *Aedes*-Borne Diseases. Geneva & Vienna; 2020.
- Vreysen MJB, Klassen W. Area-Wide Integrated Pest Management and the Sterile Insect Technique. In: *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. 2nd edn. Dyck A, Hendrichs J, Robinson AS. Boca Raton: CRC Press; 2021: 75–112.
- de Castro Ponceio L, Dos Anjos FA, de Oliveira DA, da Rosa ADO, Silva BP, Rebecchi D, et al. Prevention of a dengue outbreak via the large-scale deployment of sterile insect technology in a Brazilian city: a prospective study. *Lancet Reg Health Am*. 2023;21:100498.
- Crawford JE, Clarke DW, Criswell V, Desnoyer M, Cornel D, Deegan B, et al. Efficient production of male *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes enables large-scale suppression of wild populations. *Nat Biotechnol*. 2020;38(4):482–92.
- Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L, Lacroix R, Donnelly CA, Alphey L, et al. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):e0003864.
- Kandul NP, Liu J, Wu SL, Marshall JM, Akbari OS. Transforming insect population control with precision guided sterile males with demonstration in flies. *Nat Commun*. 2019;10(1):84.
- James S, Collins FH, Welkhoff PA, Emerson C, Godfray H CJ, Gottlieb M, et al. Pathway to deployment of gene drive mosquitoes as a potential biocontrol tool for elimination of malaria in sub-Saharan Africa: recommendations of a scientific working group. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(6_Suppl):1–49.
- Zheng X, Zhang D, Li Y, Yang C, Wu Y, Liang X, et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature*. 2019;572:56–61.
- Bouyer J, Lefrançois T. Boosting the sterile insect technique to control mosquitoes. *Trends Parasitol*. 2014;30(6):271–3.
- Bouyer J, Almenar D, Tur C, Pla Mora I, Hamidou M, Mamai W, et al. Suppression of *Aedes* mosquito populations using boosted sterile insect technique in contrasted environments. *Sci Rep*. 2024; in press.
- Devine GJ, Perea EZ, Killeen GF, Stancil JD, Clark SJ. Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(28):11530–4.
- Mamai W, Somda NSB, Maiga H, Konczal A, Wallner T, Bakhom MT, et al. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae powder as a larval diet ingredient for mass-rearing *Aedes* mosquitoes. *Parasite*. 2019;26:57.
- Mamai W, Maiga H, Somda NSB, Wallner T, Konczal A, Yamada H, et al. *Aedes aegypti* larval development and pupal production in the FAO/IAEA mass-rearing rack and factors influencing sex sorting efficiency. *Parasit Vectors*. 2020;27:43.
- Maiga H, Mamai W, Somda BM, Konczal A, Wallner T, Herranz GS, et al. Reducing the cost and assessing the performance of the adult mass-rearing cage for the dengue, chikungunya, yellow fever and Zika vector, *Aedes aegypti* (Linnaeus). *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(9):e0007775.
- Mamai W, Bueno-Masso O, Wallner T, Nikiema SA, Meletiou S, Deng L, et al. Efficiency assessment of a novel automatic mosquito pupae sex separation system in support of area-wide male-based release strategies. *Sci Rep*. 2024;14(1):9170.
- Yamada H, Dias VS, Parker AG, Maiga H, Kraupa C, Vreysen MJB, et al. Radiation dose-rate is a neglected critical parameter in dose–response of insects. *Sci Rep*. 2022;12(1):1–11.
- Balestrino F, Bimbilé Somda NS, Samuel M, Meletiou S, Bueno O, Wallner T, et al. Mass irradiation of adult *Aedes* mosquitoes using a coolable 3D printed canister. *Sci Rep*. 2024;14(1):4358.
- Maiga H, Lu D, Mamai W, Somda NSB, Wallner T, Bakhom MT, et al. Standardization of the FAO/IAEA flight test for quality control of sterile mosquitoes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:876675.
- Maiga H, Bakhom MT, Mamai W, Diouf G, Somda NSB, Wallner T, et al. From the lab to the field: Long-distance transport of sterile *Aedes* mosquitoes. *Insects*. 2023;14(2):207.
- Bouyer J, Culbert N, Dicko AH, Klaptocz A, Germann J, Wallner T, et al. Field performance of sterile male mosquitoes released from an uncrewed aerial vehicle. *Sci Robot*. 2020;5(43):eaba6251.
- Lutrat C, Burckbuehler M, Olmo RP, Beugnon R, Fontaine A, Akbari OS, et al. Combining two Genetic Sexing Strains allows sorting of non-transgenic males for *Aedes* genetic control. *Commun Biol*. 2023;6:646.
- Koskinioti P, Augustinos AA, Carvalho DO, Misbah-ul-Haq M, Pillwax G, de la Fuente LD, et al. Genetic sexing strains for the population suppression of the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018;2021(376):20190808.
- Bouyer J, Yamada H, Pereira R, Bourtzis K, Vreysen MJB. Phased conditional approach for mosquito management using the sterile insect technique. *Trends Parasitol*. 2020;36(4):325–36.
- Foley N, Fouque F, Zhong Q, Bossin H, Bouyer J, Velayudhan R et al. Building capacity for testing the sterile insect technique (SIT) against *Aedes*-borne diseases in the Pacific: a training workshop and launch of the SIT trials against *Aedes aegypti* and arboviral diseases. *Infect Dis Poverty*. 2024; in press.
- Ng LC. *Wolbachia*-mediated sterility suppresses *Aedes aegypti* populations in the urban tropics. medRxiv 2021; <https://doi.org/10.1101/2021.06.16.21257922>
- Lim JT, Bansal S, Chong CS, Dickens BS, Ng Y, Deng L, et al. Efficacy of *Wolbachia*-mediated sterility to reduce the incidence of dengue: a synthetic control study in Singapore. *Lancet Microb*. 2024;5(5):e422–32.
- Soh S, Ho SH, Seah A, Ong J, Dickens BS, Tan KW, et al. Economic impact of dengue in Singapore from 2010 to 2020 and the cost-effectiveness of *Wolbachia* interventions. *PLoS Global Public Health*. 2021;1(10):e0000024.
- Bansal S, Lim JT, Chong C-S, Dickens BS, Ng Y, Deng L, et al. Effectiveness of *Wolbachia*-mediated sterility coupled with sterile insect technique to suppress adult *Aedes aegypti* populations in Singapore: a synthetic control study. *Lancet Planet Health*. 2024;8(9):e617–28.
- Bouyer J, Vreysen MJB. Yes, Irradiated sterile male mosquitoes can be sexually competitive! *Trends Parasitol*. 2020;36(11):877–80.
- Yamada H, Maiga H, Bimbilé Somda NS, Carvalho D, Mamai W, Kraupa C, et al. The role of oxygen depletion and subsequent radioprotective effects during irradiation of mosquito pupae in water. *Parasit Vectors*. 2020;13:198.
- Yamada H, Maiga H, Kraupa C, Mamai W, Somda NSB, Abraham A, et al. Effects of chilling and anoxia on the irradiation dose-response in adult *Aedes* mosquitoes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:856780.
- Bouyer J. When less is more: accounting for overcompensation in mosquito SIT projects. *Trends Parasitol*. 2023;2356:1–3.
- Zhang D, Maiga H, Li Y, Bakhom MT, Wang G, Sun Y, et al. Mating harassment may boost the effectiveness of the sterile insect technique for *Aedes* mosquitoes. *Nat Commun*. 2024;15(1):1980.

Supplementary Material

Supplementary Table 1: List of ongoing SIT projects against mosquitoes. Updated from Tables 4 and 5 from [1]. This list is not exhaustive: all projects where no updates were found online in February 2024 were removed from the list.

Country	City	Approach	Size of release area (ha)	Inhabitants in the release area	Average release density (/ha/w)	Current status & perspectives	Species	Phase in 2024	Source
Albania	Tirana	SIT	12	NA	NA	MRR in 2018 completed with sterile males from the local strain produced in Italy (CAA). Development of local production of sterile males ongoing.	<i>Ae. albopictus</i>	I	[2]
Bangladesh	Dhaka	SIT	NA	NA	NA	Evaluation of mass-rearing and irradiation procedures in the lab.	<i>Ae. aegypti</i>	I	[3]
Brazil	Recife	SIT	56	18300	5000	MRR in Carnaiba in 2018 to test drone release. 19% suppression in the wild mosquito population in Recife. Project ongoing to upscale and measure epidemiological impact on Fernando de Noronha island.	<i>Ae. aegypti</i>	II	https://www.iaea.org/newscenter/news/nuclear-science-to-control-mosquitoes-generate-clean-energy-a-key-focus-of-director-general-grossis-visit-to-brazil [4, 5]
Burkina Faso	Bobo Dioulasso	SIT	NA	NA	NA	Baseline data collection for 3 years. Building and equipment of a mass-rearing facility.	<i>Ae. aegypti</i>	I	R. Dabire, pers. com.
China	Guangzhou	SIT	1.2	4750	166666	No induced sterility but 40% reduction of female density in BG traps and 80% in Human Landing Catch due to male mating harassment.	<i>Ae. albopictus</i>	II	[6]
China	Guangzhou	IIT / SIT	35	2215	100000	Field pilot trial completed (>99% suppression of females) and pre-operational trials ongoing for cost reduction, with commercial activity by Guangzhou Wolbaki Biotech Co. Ltd.	<i>Ae. albopictus</i>	III	[7]
Croatia	Premantura	SIT	30	NA	2000	Field pilot completed with sterile males from an Italian strain produced in Italy (CAA). 60% induced sterility and 45% suppression of adults.	<i>Ae. albopictus</i>	II	https://www.rfi.fr/en/science-environment/20230720-croatia-targets-latest-climate-change-threat-mosquitoes G. Vignjević, pers. com.
Cuba	La Habana	SIT	50	NA	1270	100% suppression of egg densities in the pilot area. RTC planned in La Habana to measure epidemiological impact.	<i>Ae. aegypti</i>	II	[8] [9]
Cyprus	Kiti	SIT	50	NA	2000	Elimination trial ongoing. Sterile males produced by FAO-IAEA, Austria. No information available on the results.	<i>Ae. aegypti</i>	II	[10] https://www.iaea.org/newscenter/pressreleases/nuclear-technique-used-in-europe-for-first-time-to-battle-yellow-fever-mosquito-found-in-cyprus

Ecuador	Galapagos	SIT	NA	NA	NA	Small insectary, rearing local strain, irradiation capacity, trapping & monitoring field sites in progress.	<i>Ae. aegypti</i>	I	https://www.geneconveni.org/articles/galapagos-to-receive-male-mosquitoes-for-vector-control-in-ecuador/
France	French Polynesia	SIT	NA	NA	NA	BLDC. Building of mass-rearing facility, purchase of irradiator. Plan of a pilot trial to measure entomological and epidemiological impacts.	<i>Ae. aegypti</i>	I	[11]
France	Montpellier	SIT	10	NA	NA	MRR to test drone release of sterile males with sterile males from a local strain produced in Italy (CAA). Perspective of upscale by Terratis.	<i>Ae. albopictus</i>	I	https://www.eid-med.org/projet-tis/ https://terratis.fr/
France	Reunion Island	SIT	32	NA	3000	Pilot trial completed, 50% induced sterility. Shift to boosted SIT (phase 3) planned in 2024.	<i>Ae. albopictus</i>	II	https://www.ird.fr/la-technique-de-linsecte-sterile-reduit-de-50-la-fertilite-des-moustiques-aedes-albopictus-duparc [12, 13]
France	Reunion Island	Boosted SIT	10	171 households	353	Pilot trial completed, 90% reduction of the target species, 60% reduction of <i>Ae. albopictus</i> . Phase 3 planned in 2024. Perspective of upscale by MoSITouch.	<i>Ae. aegypti</i>	II	https://www.cirad.fr/espace-presse/communiqués-de-presse/2021/tis-renforcee-moustique-reunion [14] https://www.mositouch.com/
Germany	Heidelberg & Freiburg	SIT	10	NA	1000-2300	Field pilot completed with sterile males from a local strain produced in Italy (CAA). 56-82% induced sterility. No information available on a follow-up.	<i>Ae. albopictus</i>	II	[15]
Greece	Vavrona (Athens)	SIT	10	NA	3000	Field pilot completed with sterile males from a local strain produced in Italy (CAA). 78% reduction in egg density. Shift to a phase 2 trial of boosted SIT in the same site (ongoing) / development of local production of sterile males ongoing.	<i>Ae. albopictus</i>	II	[16] https://www.mosquitosit.gr/
Greece	Vavrona (Athens)	SIT	10	NA	3000	Intermittent releases (beginning and end of the mosquito season). >95% reduction of adult density measured with Human Landing Catch	<i>Ae. albopictus</i>	II	A. Michaelakis, pers. com.
Indonesia	Pasar Jumat-Lebak Bulus (Jakarta)	SIT	25	NA	NA	50% induced sterility. Extension of the trials ongoing.	<i>Ae. aegypti</i>	II	[17]
Italy	Caselline, Boschi, Budrio, Santamonica	SIT	80	NA	1600	Field pilot completed in 2013. 70–80% induced sterility and suppression of egg densities.	<i>Ae. albopictus</i>	II	[18]
Italy	Bologna	SIT	70-100	NA	2081-3265	34-48% induced sterility and 47-56% egg reduction from 2021-2023. Pre-operational trials ongoing for cost reduction, with commercial activity by Centro Agricoltura Ambiente “G.Nicoli” (CAA).	<i>Ae. albopictus</i>	III	[19] Information provided by CAA.

Jamaica	Kingston (St. Catherine Parish)	SIT	NA	NA	NA	Medium scale production, trapping & monitoring field sites, MRR. No update on the field trial available.	<i>Ae. aegypti</i> & <i>Ae. albopictus</i>	I	https://jis.gov.jm/jamaica-to-undertake-mosquito-sterilisation-pilot-project/
Malaysia	Melaka state	SIT	4	16000	NA	MRR conducted. Extension of the trials ongoing.	<i>Ae. aegypti</i>	II	[20, 21]
Mauritius	Panchvati	SIT	3	NA	20000	55.7 % suppression of egg densities and 63.6% suppression of adult females. New pilot trial ongoing in an urban area (Ministry of Health).	<i>Ae. albopictus</i>	II	[22]
Mexico	Tapachula	SIT	24	697	6000	BLDC. MRR conducted to assess drone release of sterile males. No available report on the suppression trial. No information available on a follow-up.	<i>Ae. aegypti</i>	II	[23, 24]
Mexico	Merida	IIT / SIT	50	1241	4000	Pilot trial show suppression of egg hatch by 76.5 -91.9%, indoor females by 47.7-90.9% and outdoor females by 50.0–75.2%. Ongoing USAID project will test the impact on disease transmission and cost effectiveness at scale for transition to phase IV.	<i>Ae. aegypti</i>	III	[25] https://divportal.usaid.gov/s/project/a0g3d00000cNZZAA2/testing-a-combined-sitiit-approach-to-control-mosquitoborne-diseases-at-scale?utm_medium=email&utm_source=gov_delivery
Philippines	Old Balara	SIT	NA	NA	NA	Building of mass-rearing facility, purchase of irradiator.	<i>Ae. aegypti</i>	I	[26]
Portugal	Faro	SIT	NA	1946	4000	Field pilot completed with sterile males from the local strain produced in Italy (CAA). No result published yet.	<i>Ae. albopictus</i>	II	H. C. Osório, pers. com.
Senegal	Dakar	SIT	NA	NA	NA	MRR in Dakar using sterile males produced in Austria and transported as chilled irradiated adults in insulated boxes (FAO-IAEA Insect Pest Control Laboratory).	<i>Ae. aegypti</i>	I	[27] Gueye Fall & T. Bakhoum, pers.com.
Serbia	Novi Sad	SIT	17.2	3000-4000	4444	Field pilot completed with sterile males from an Italian strain produced in Italy (CAA). 51.5% induced sterility and 64% suppression of egg density. Perspectives of upscale through a national IAEA TC project and the private company BIODRON 369.	<i>Ae. albopictus</i>	II	https://www.srbatom.gov.rs/srbatommm/ped-eset-hiljada-sterilnih-muzjaka-tigrastog-komarca-pusteno-u-novom-sadu-u-okviru-projekta-za-kontrolu-stetocina-na-ekoloski-prihvatljiv-i-odrziv-nacin/?lang=en A. I. Cupina, pers. com.
Singapore	Yishun, Tampines, Bukit Batok and Choa Chu Kang	IIT / SIT	1033	607 872	NA	Suppression of adult females by 92.7% and 98.3% in two pilot sites. Epidemiological trial demonstrated an average reduction in dengue incidence rate of 56-88% overall (95% CI 51-88–58-46) at an average coverage of 34-49%; 65-81% (64-24–67-26) at a 68-07% coverage and up to 71-01% (163 of 230, 69-47–72-41) in Yishun, at a 72-79% coverage. Operated by the National Environment Agency within the country's integrated vector control management strategy.	<i>Ae. aegypti</i>	IV	[28, 29]
South Africa	KwaZulu / Natal	SIT	5	NA	5000	BLDC, operational research, insectary with irradiation capacity, communication campaign, MRR	<i>An. arabiensis</i>	I	[30]

Spain	La Vilavella & Polinyà de Xuquer	Boosted SIT	58	NA	2620 - 2712	Suppression of adults by 89 to 98%.	<i>Ae. albopictus</i>	II	[14]
Spain	Valencian Community	SIT	177	NA	2250	19.5 -31.7% induced sterility, concurrent to a 70–80% suppression of adult females in a 45ha pilot area. Pre-operational trials and R&D activities for cost reduction ongoing by Generalitat Valenciana and Grupo Tragsa.	<i>Ae. albopictus</i>	III	[31, 32]
Sri Lanka	Colombo	SIT	30	NA	3300	95.5% suppression of adult females. Extension of the trials ongoing.	<i>Ae. albopictus</i>	II	Prof. Menaka D. Hapugoda, pers com. [33]
Sudan	Dongola	SIT	NA	NA	NA	MRR in 2016. Dose-response curve, development of mass-rearing. Field trial cancelled.	<i>An. arabiensis</i>	I	[34, 35]
Switzerland	Ticino	SIT	45	NA	3000	Field pilot completed with sterile males from the local strain produced in Italy (CAA). 18% induced sterility and 66.7% reduction in adult females density.	<i>Ae. albopictus</i>	II	[36]
Thailand	Plaeng Yao District	IIT / SIT	5	NA	5000	84% induced sterility and 97.3% suppression of the mean number of females per household. Plan for a RCT to measure epidemiological impact presented to WHO-VCAG but no information available on a follow-up.	<i>Ae. aegypti</i>	II	[37]
USA	Captiva island, Florida	SIT	230	379	5000	Suppression > 95% of adults. Shift to Fort Myer because of a cyclone.	<i>Ae. aegypti</i>	II	[38]
USA	St. Augustine, Florida	SIT	NA	NA	NA	Dose-response curve conducted. Pilot site identified.	<i>Ae. aegypti</i>	I	[39]

BLDC = baseline data collection conducted. **SIT**= Sterile insect technique; **IIT**= Incompatible insect technique; **MRR**= Mark–release–recapture; **NA**= Not available

Supplementary References

1. FAO, IAEA: **Thematic Plan for the Development and Application of the Sterile Insect Technique (SIT) and Related Genetic and Biological Control Methods for Disease Transmitting Mosquitoes**. In.; 2019: 94.
2. Velo E, Balestrino F, Kadriaj P, Carvalho D, Dicko AH, Bellini R, Puggioli A, Petric D, Michaelakis A, Schaffner F *et al*: **A Mark-Release-Recapture study to estimate field performance of imported radio-sterilized male *Aedes albopictus* in Albania**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2022, **10**:833698.
3. Hossain MF, Ghosh A, Sultana N, Momen M, Hossain MA, Khan SA, Seheli K: **Optimization of irradiation sterility dose of the male *Aedes aegypti* (Linnaeus) Mosquito: A laboratory study in Bangladesh**. *Int J Trop Insect Science* 2022, **42**(2):1421-1428.

4. Bouyer J, Culbert N, Dicko AH, Klaptocz A, Germann J, Wallner T, Herranz GS, Argiles Herrero R, Virgilio J, Gomez M *et al*: **Field performance of sterile male mosquitoes released from an uncrewed aerial vehicle**. *Science Robotics* 2020, **5**(43):eaba6251.
5. Virginio JF: **Country report on the ongoing pilot SIT trials and plans for epidemiological trials in Brazil**. *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
6. Zhang D, Bouyer J: **Mating harassment may boost the effectiveness of the sterile insect technique for *Aedes* mosquitoes**. *Nature communications* 2024, **in press**.
7. Zheng X, Zhang D, Li Y, Yang C, Wu Y, Liang X, Yan Z, Hu L, Sun Q, Liang Y *et al*: **Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes**. *Nature* 2019, **572**:56-61.
8. Gato R, Menéndez Z, Prieto E, Argilés R, Rodríguez M, Baldoquín W, Hernández Y, Pérez D, Anaya J, Fuentes I *et al*: **Sterile Insect Technique: Successful Suppression of an *Aedes aegypti* Field Population in Cuba**. *Insects* 2021, **12**(5):469.
9. Gato R: **SIT in Cuba**. *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
10. Vasquez MI, Notarides G, Meletiou S, Patsoula E, Kavran M, Michaelakis A, Bellini R, Toumazi T, Bouyer J, Petrić D: **Two invasions at once: update on the introduction of the invasive species *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Cyprus—a call for action in Europe**. *Parasite* 2023, **30**:41.
11. Bossin H: **SIT in the Pacific**. *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
12. Gouagna LC, Damiens D, Oliva CF, Boyer S, Le Goff G, Brengues C, Dehecq J-S, Raude J, Simard F, Fontenille D: **Strategic approach, advances, and challenges in the development and application of the SIT for area-wide control of *Aedes albopictus* mosquitoes in Reunion Island**. *Insects* 2020, **11**(11):770.
13. Simard F: **SIT in Indian Ocean**. *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
14. Bouyer J, Almenar D, Tur C, Pla Mora I, Hamidou M, Mamai W, Yamada H, Gouagna LC, Rossignol M, Chandre F *et al*: **Suppression of *Aedes* mosquito populations using boosted sterile insect technique in contrasted environments**. *Scientific Reports* 2024, **in press**.
15. Becker N, Langentepe-Kong SM, Tokatlian Rodriguez A, Oo TT, Reichle D, Lühken R, Schmidt-Chanasit J, Lüthy P, Puggioli A, Bellini R: **Integrated control of *Aedes albopictus* in Southwest Germany supported by the Sterile Insect Technique**. *Parasites & Vectors* 2022, **15**(1):1-19.
16. Balatsos G, Karras V, Puggioli A, Balestrino F, Bellini R, Papachristos DP, Milonas PG, Papadopoulos NT, Malfacini M, Carrieri M *et al*: **Sterile Insect Technique (SIT) field trial targeting the suppression of *Aedes albopictus* (Skuse) in Greece**. *Parasite* 2024, **31**(17):11.
17. Sasmita HI: **Country report on the ongoing pilot SIT trials and plans for epidemiological trials in Indonesia**. *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
18. Bellini R, Medici A, Puggioli A, Balestrino F, Carrieri M: **Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas**. *J Med Entomol* 2013, **50**(2):317-325.
19. Bouyer J, Pla Mora I, Mikaelakis A, Bellini R: **New developments in the use of the Sterile Insect Technique against *Aedes albopictus* in Europe**. In: *5th International Workshop on *Aedes albopictus*, the Asian tiger mosquito* vol. Invited conference. Montpellier: IRD; 2022: 23.
20. Nazni WA, Teoh G-N, Shaikh Norman Hakimi SI, Muhammad Arif MA, Tanusshni M, Nuradila MA, Nurfarahin Hanini A, Shazia IA, Tan A-M, Rabizah H: ***Aedes* Control Using Sterile Insect Technique (SIT) in Malaysia**. In: *Genetically Modified other Innovative Vector Control Technologies: Eco-bio-social Considerations for Safe Application*. edn. Edited by Tyagi BK. Singapore: Springer; 2021: 143-162.

21. Ling CY: **Country report on the ongoing pilot SIT trials and plans for epidemiological trials in Malaysia.** *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
22. Iyaloo DP, Bouyer J, Facknath S, Bheecarry A: **Pilot Suppression trial of *Aedes albopictus* mosquitoes through an Integrated Vector Management strategy including the Sterile Insect Technique in Mauritius.** *bioRxiv* 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.09.06.284968>.
23. Marina CF, Liedo P, Bond JG, R. Osorio A, Valle J, Angulo-Kladt R, Gómez-Simuta Y, Fernández-Salas I, Dor A, Williams T: **Comparison of ground release and drone-mediated aerial release of *Aedes aegypti* sterile males in southern Mexico: efficacy and challenges.** *Insects* 2022, **13**(4):347.
24. Marina CF, Bond JG, Hernández-Arriaga K, Valle J, Ulloa A, Fernández-Salas I, Carvalho DO, Bourtzis K, Dor A, Williams T: **Population dynamics of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in two rural villages in southern Mexico: Baseline data for an evaluation of the sterile insect technique.** *Insects* 2021, **12**(1):58.
25. Martín-Park A, Che-Mendoza A, Contreras-Perera Y, Pérez-Carrillo S, Puerta-Guardo H, Villegas-Chim J, Guillermo-May G, Medina-Barreiro A, Delfín-González H, Méndez-Vales R *et al*: **Pilot trial using mass field-releases of sterile males produced with the incompatible and sterile insect techniques as part of integrated *Aedes aegypti* control in Mexico.** *PLoS Negl Trop Dis* 2022, **16**(4):e0010324.
26. Lees RS, Carvalho DO, Bouyer J: **Potential impact of integrating the sterile insect technique into the fight against disease-transmitting mosquitoes.** In: *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Second edition edn. Edited by Dyck AV, Hendrichs J, Robinson AS. Vienna: CRC Press; 2021: 1082-1118.
27. Maiga H, Bakhoun MT, Mamai W, Diouf G, Somda NSB, Wallner T, Martina C, Kotla SS, Masso OB, Yamada H *et al*: **From the lab to the field: Long-distance transport of sterile *Aedes* mosquitoes.** *Insects* 2023, **14**(2):207.
28. Ng LC: ***Wolbachia*-mediated sterility suppresses *Aedes aegypti* populations in the urban tropics.** *medRxiv* 2021, [10.1101/2021.06.16.21257922](https://doi.org/10.1101/2021.06.16.21257922)
29. Lim JT, Bansal S, Chong CS, Dickens BS, Ng Y, Deng L, Lee CW, Tan LW, Chain G, Ma P *et al*: **Efficacy of *Wolbachia*-mediated sterility to reduce the incidence of dengue: a synthetic control study in Singapore.** *The Lancet Microbe* 2024, **5**(5):e422-e432.
30. Kaiser ML, Wood OR, Damians D, Brooke BD, Koekemoer LL, Munhenga G: **Estimates of the population size and dispersal range of *Anopheles arabiensis* in Northern KwaZulu-Natal, South Africa: implications for a planned pilot programme to release sterile male mosquitoes.** *Parasites & Vectors* 2021, **14**(1):1-18.
31. Tur C, Almenar D, Zacarés M, Benlloch-Navarro S, Pla I, Dalmau V: **Suppression Trial through an Integrated Vector Management of *Aedes albopictus* (Skuse) Based on the Sterile Insect Technique in a Non-Isolated Area in Spain.** *Insects* 2023, **14**(8):688.
32. Tur C, Almenar D, Benlloch-Navarro S, Argilés-Herrero R, Zacarés M, Dalmau V, Pla I: **Sterile insect technique in an integrated vector management program against tiger mosquito *Aedes albopictus* in the Valencia region (Spain): operating procedures and quality control parameters.** *Insects* 2021, **12**(3):272.
33. Dheerasinghe AF: **Country report on the ongoing pilot SIT trials and plans for epidemiological trials in Sri Lanka.** *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
34. Ageep TB, Damians D, Alsharif B, Ahmed AB, Salih EHO, Ahmed FTA, Diabaté A, Lees RS, Gilles JRL, El Sayed B: **Participation of irradiated *Anopheles arabiensis* males in swarms following field release in Sudan.** *Malar J* 2014, **13**(1):1-11.

35. Elaagip A, Adedapo A: **Three Decades of Malaria Vector Control in Sudan: The Plausible Role of Sterile Insect Technique (SIT)**. In: *Genetically Modified other Innovative Vector Control Technologies: Eco-bio-social Considerations for Safe Application*. edn. Edited by Tyagi BK; 2021: 119-129.
36. Flacio E: **SIT in Switzerland against *Aedes albopictus***. *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
37. Kittayapong P, Ninphanomchai S, Limohpasmanee W, Chansang C, Chansang U, Mongkalagoon P: **Combined sterile insect technique and incompatible insect technique: The first proof-of-concept to suppress *Aedes aegypti* vector populations in semi-rural settings in Thailand**. *PLoS Negl Trop Dis* 2019, **13**(10):e0007771.
38. Foley N: **SIT in Florida**. *Infectious Diseases of Poverty* 2024, **Special Issue on TDR Training Workshop on SIT (Tahiti, May 2023)**:submitted.
39. Chen C, Aldridge RL, Gibson S, Kline J, Aryaprema V, Qualls W, Xue Rd, Boardman L, Linthicum KJ, Hahn DA: **Developing the radiation-based sterile insect technique (SIT) for controlling *Aedes aegypti*: identification of a sterilizing dose**. *Pest manag sci* 2023, **79**(3):1175-1183.