

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA  
XXX° CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Patologie in *Theba pisana* e *Cornu aspersum* in ambiente  
naturale e in allevamento intensivo**

COORDINATORE DOTTORANDO

Ch.mo Prof. Salvatore Cozzolino

TUTOR

Ch.mo Prof. Gionata De Vico

PhD student:

Dott. Andrea Costantino

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

# RINGRAZIAMENTI

Mi sembra doveroso, alla fine di un percorso durato tre anni, ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine e che mi hanno permesso di giungere a questo traguardo.

Questi tre anni passati all'interno del Dipartimento di Biologia mi hanno permesso di stringere rapporti con Professori, Ricercatori e colleghi che si sono succeduti nel tempo. Sarebbe ingiusto ringraziare qualcuno in particolare perché con TUTTI ho instaurato rapporti di amicizia, stima e fiducia.

Un ringraziamento particolare va al Prof. Gionata De Vico, alla Prof. Francesca Carella ed alla Dott. Grazia Villari. Tutto quello che ho imparato lo devo a loro, si sono mostrati sempre disponibili e comprensivi e mi hanno aiutato a risolvere dubbi teorici e pratici nati nel tempo. Desidero inoltre ringraziare il Prof. Pierre Edouard Fournier per avermi ospitato presso i suoi laboratori nella struttura dell'IHU di Marsiglia nella quale ho potuto approfondire e imparare tecniche e metodi di biologia molecolare. Ringrazio, inoltre, l'intero Dipartimento per avermi offerto la possibilità di usufruire delle attrezzature di laboratorio. In ultimo non posso non ringraziare la mia famiglia che mi ha sempre sostenuto nei momenti difficili e che ha sempre gioito con me per i risultati raggiunti.

# PRESENTAZIONE DEL PROGETTO

I molluschi sono il secondo più grande phylum animale, comprende circa il 7% degli animali vivi e degli habitat occupati che vanno dalle regioni alpine fino al largo delle acque profonde, con una vasta gamma di stili di vita, tra cui predatori, erbivori, detritivori e filtratori (Benkendorff K. 2010). La classe più abbondante di molluschi sono i gasteropodi, che includono i polmonati terrestri che si sono evoluti, indipendentemente dagli altri molluschi, alla vita terrestre. Data la loro adattabilità a una gamma di diversi ecosistemi, i molluschi sono noti da molto tempo per essere ospiti ideali per diversi parassiti, tra cui nematodi e trematodi (Adema 2012).

Lo studio di gasteropodi polmonati ha una rilevanza sempre crescente nella ricerca biomedica. Sono infatti ospiti intermedi e vettori di diversi agenti patogeni per l'uomo e gli animali, cosiddette Snail Borne Diseases (SBD) (Giannelli et al., 2015). Si stima che almeno 300 milioni di persone che vivono in aree socialmente svantaggiate, specialmente nei paesi in via di sviluppo, soffrono di malattie debilitanti e spesso mortali trasmesse da questi vettori (Giannelli et al., 2015). Queste includono Schistosomiasi, Echinostomiasi, Fascioliasi, Fasciolopsiasi, Paragonimiasi, Opistorchiasi, Clonorchiasi e Angiostrongylasi.

I cambiamenti climatici globali, il commercio internazionale di chioccioline per alimentazione e le migrazioni di popoli dalle aree ad alto rischio epidemiologico, stanno modificando il modello geografico e le dinamiche di trasmissione dei patogeni legate alla SBD, a causa della redistribuzione dei vettori, all'allargamento della gamma parassita-ospite e dei patogeni ad essi associati (Martens, 1995). Di conseguenza, le SBD stanno emergendo anche in zone, Europa compresa, precedentemente considerate come libere da tale tipo di dinamiche epidemiologiche. Un recente articolo di Adema et al. (2012) sottolinea la necessità di uno sforzo globale della ricerca sia di base che applicata, per sradicare la SBD nell'uomo e negli animali.

Oggi, alcune specie di chioccioline rappresentano una risorsa alimentare per milioni di persone in tutto il mondo (Parlapani F.F, Neofitou e Boziaris, 2014), in Francia il consumo raggiunge i 40.000 tonnellate all'anno (Daguzan, 1989; Kiebre-

Toe et al., 2003). In Spagna, il consumo attuale è stimato in circa 16000 tonnellate l'anno mostrando una chiara tendenza all'aumento (Ministerio de Medio Ambiente e Medio Rural y Marino, 2008).

*Cornu aspersum*, *Helix spp.*, *Achatina spp.* sono specie raccolte a scopo alimentare principalmente negli Stati Uniti, in Europa e nell'Estremo Oriente. Tra queste, *C. aspersum* (precedentemente noto come *Helix aspersa*, Müller, 1774) costituisce, insieme a *Theba pisana*, una delle più importanti specie di chioccioline allevate in Europa in ambito commerciale a scopo alimentare.

Tuttavia, *C. aspersum* e *T. pisana* sono anche riconosciute come vettori emergenti di alcuni SBD in tutto il mondo (Giannelli et al., 2015).

La conoscenza di base della biologia di questi animali risulta indispensabile per comprendere l'interazione ospite-patogeno e la trasmissione delle malattie alle specie suscettibili (Giannelli et al., 2015). La relativa mancanza di risorse bibliografiche complete riguardanti la biologia delle specie prese in esame, impone un approfondimento sullo sviluppo di strumenti diagnostici rapidi negli studi epidemiologici su larga scala. In questo contesto, la conoscenza dell'organizzazione anatomica, ultrastrutturale, della fisiologia e della patologia di tali organismi è elemento chiave per la gestione delle problematiche biomediche e agro-zootecniche ad esse correlate. Per tale motivo è stato avviato uno studio epidemiologico ed eziopatogenetico sugli aspetti sanitari relativi alle due specie sia in ambiente naturale che in allevamento intensivo. I risultati ottenuti, rappresentano i primi dati di riferimento in questo ambito in Italia.

Sulla base delle sezioni istologiche e successive osservazioni al microscopio ottico sono state descritte:

- la topografia/architettura generale e le caratteristiche citologiche ed istologiche di sistemi e apparati delle due specie prese in esame.
- I sistemi di allevamento e le patologie associate nonché i risultati della ricerca con i lavori correlati.

# Indice

<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>2</b>
<b>PRESENTAZIONE DEL PROGETTO</b>	<b>3</b>
<b>Capitolo I - Anatomia di Cornu aspersum e Theba pisana</b>	<b>7</b>
1. Introduzione	7
1.1 Architettura generale anatomica	7
1.1.1 Conchiglia	8
1.1.2 Mantello	9
1.1.3 Piede	10
1.1.4 Tegumento e tipologie cellulari	12
1.1.5 Bocca e apparato radulare	16
1.1.6 Sistema nervoso	17
1.1.7 Ghiandole salivari	20
1.1.8 Massa viscerale	21
1.1.9 Ghiandola digerente	21
1.1.10 Intestino	24
1.1.11 Cavità polmonare	25
1.1.12 Apparato cardio-renale	26
1.1.13 Apparato riproduttore	31
1.1.14 Ghiandole sessuali accessorie	34
<b>Capitolo II - Tecnologie di allevamento</b>	<b>36</b>
2.1 Specie di interesse commerciale	36
2.2 Attività elicicola: storia, tradizione e prospettive	39
2.3 Sperimentazione in allevamento	41
2.4 Tipologie di allevamento per Cornu aspersum	42
2.5 Fattori chiave per la riuscita di un impianto elicicolo	44
2.5.1 Temperatura	45
2.5.2 Densità	46
2.5.3 Natura del suolo	46
2.5.4 Elementi Essenziali	47
2.5.5 Alimentazione	48
2.6. Pianificazione del campo	49

2.6.1 Raccolta	50
2.6.2 Attività amministrative	51
2.6.3 Legislazione	51
2.7.1 Manutenzione sanitaria degli impianti	52
2.7.2 Piano sanitario	52
2.8. Patologie in allevamento	54
2.8.1 Nematodi	55
2.8.2 Flagellati	56
2.8.3 Trematodi	56
2.8.4 Acari	57
2.8.6 Ditteri	58
2.8.7 Funghi	58
2.8.8 Altre cause di mortalità	59
2.9. Possibili contaminazioni da metalli pesanti	59
2.10 Pest snail	60
2.10.1 Controllo chimico dei gasteropodi terrestri	62
<b>Capitolo III - Patologie in Theba pisana e Cornu aspersum in ambiente naturale e in allevamento intensivo</b>	<b>64</b>
3.1 - Prime Osservazioni su un agente infettivo di probabile natura virale in Theba pisana (Gastropoda: Pulmonata).	65
3.1.1 Riassunto	65
3.1.2 Introduzione	65
3.1.3 Materiali e metodi	66
3.1.4 Risultati e discussione	66
3.2 - Mortalità di massa di Cornu aspersum in allevamenti italiani: un'indagine istopatologica e molecolare	68
3.2.1 Materiali e metodi	69
3.2.2 Risultati	70
3.2.3 Discussione	71
<b>4. Considerazioni conclusive</b>	<b>72</b>
<b>5. Pubblicazioni allegate</b>	<b>72</b>
5.1 Allegato 1	72
5.2 Allegato 2	74
<b>Bibliografia</b>	<b>75</b>

# Capitolo I - Anatomia di *Cornu aspersum* e *Theba pisana*

## 1. Introduzione

Nel primo capitolo verrà affrontato lo studio dell'organizzazione anatomica dei Gasteropodi polmonati con particolare riferimento a due specie, *Cornu aspersum* e *Theba pisana*. Sulla base delle sezioni istologiche e successive osservazioni al microscopio ottico sono state descritte: la topografia/architettura generale e le caratteristiche citologiche ed istologiche di sistemi e apparati delle due specie prese in esame. L'analisi delle sezioni sia sul piano longitudinale che trasversale permette di localizzare e riconoscere gli organi principali e il piano di organizzazione tipici dei gasteropodi polmonati.

### 1.1 Architettura generale anatomica

Il corpo è racchiuso in una conchiglia ed è costituito da tre regioni: una testa, un piede muscolare, e una massa viscerale spiralizzata.

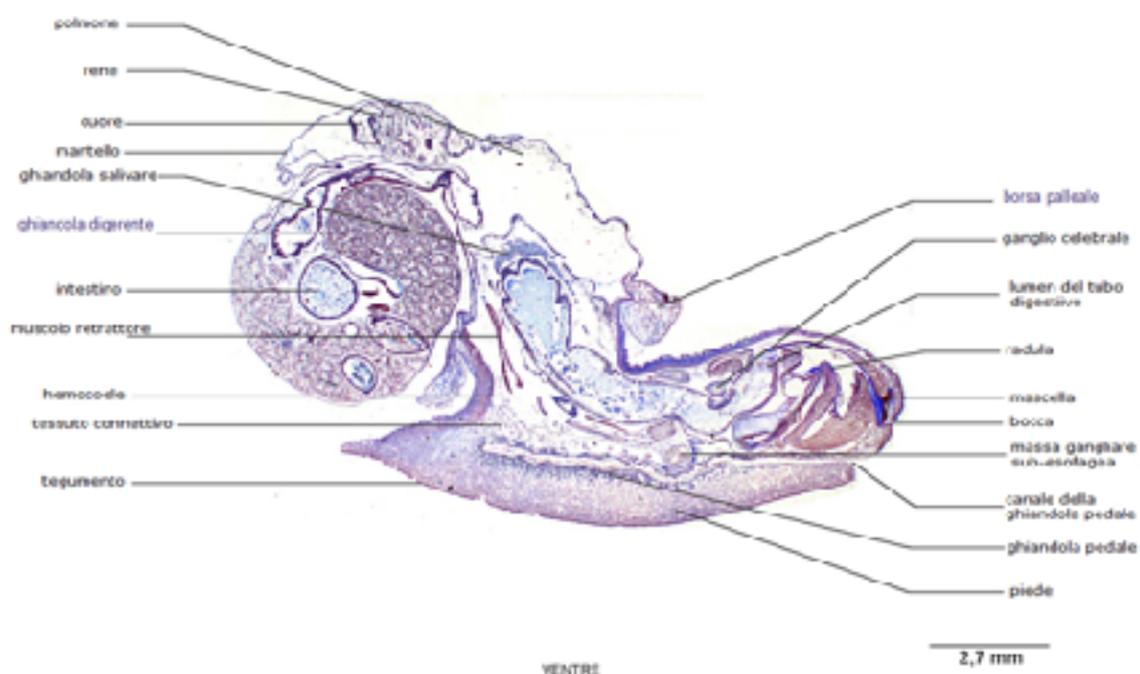


Fig. 1: Organizzazione anatomica in visione sagittale di *Cornu aspersum*; individuo allo stadio giovanile. Heusser & H.-G. Dupuy (2011).

Esso presenta una parte inferiore appiattita, che se estroflessa all'esterno della conchiglia permette lo spostamento dell'animale tramite contrazioni ritmiche della muscolatura, tali contrazioni provocano la spremitura e lo stimolo delle ghiandole secretici epidermiche le quali producono un flusso di muco che permette lo slittamento locale del piede sul supporto. Il corpo può essere completamente retratto da un muscolo attaccato all'asse *columellare*, e attraverso una barriera composta da una matrice proteica e sali di calcio (epifragma), può completamente sigillarsi all'interno della conchiglia stessa. L'epifragma protegge l'apertura boccale, durante l'ibernazione o l'estivazione, dalle possibili infezioni o traumi, una volta essiccato permette la ritenzione dell'umidità consentendo lo scambio di gas con l'ambiente esterno (Barnhart MC., 1983). Nel momento in cui si ripristinano le condizioni fisiologiche ottimali l'epifragma viene disciolto da enzimi specifici (Campion, 1961).

### 1.1.1 Conchiglia

In relazione alla composizione, i gusci dei molluschi hanno una consistenza dura e rigida.

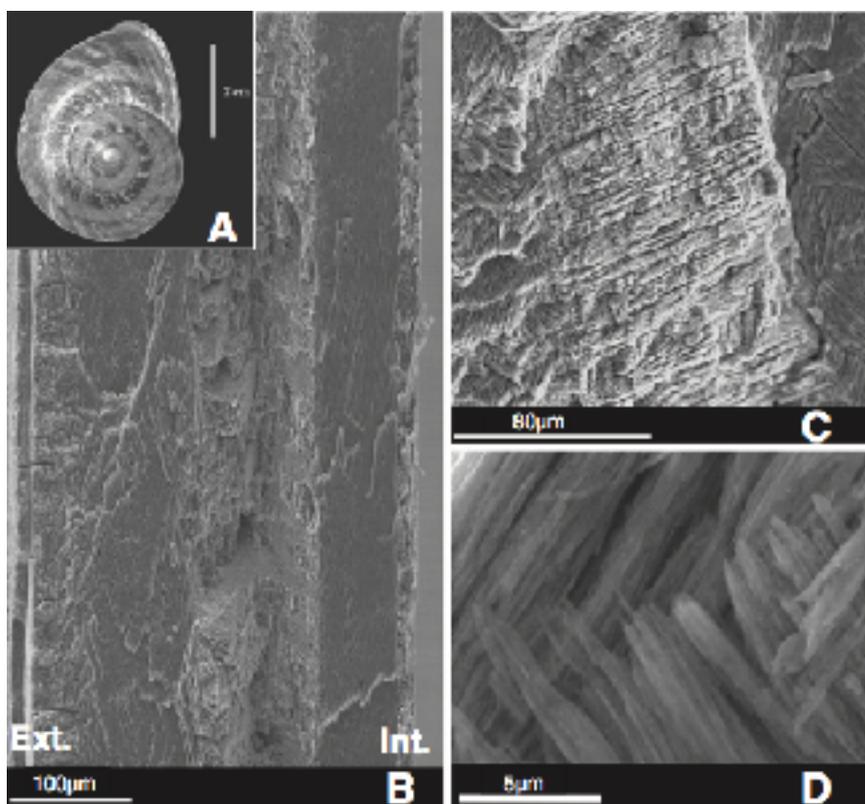


Fig. 2: Conchiglia di *Cornu aspersum* A: visione macroscopica. B–D: visione microscopica della microstruttura degli strati della conchiglia; Pavat et al. (2012).

*Cornu aspersum* come *Theba pisana* presenta una conchiglia avvolta a spirale che elicita intorno ad un asse, la columella. La conchiglia prende forma da una stratificazione periodica che origina dal bordo del mantello (C. Pavat et al.; 2012).

Il tipo di accrescimento segue una forma a spirale logaritmica, mantenendo proporzioni isometriche tra i parametri di lunghezza, area e volume.

L'intera ontogenesi prende forma intorno alla columella alla quale sono attaccati i muscoli responsabili della ritrazione della massa viscerale all'interno della conchiglia stessa.

La conchiglia è tipicamente composta da tre strati:

Il periostraco, che si trova nella porzione più esterna (Fig. 2) e risulta essere molto resistente, di natura organica; si compone di conchiolina, aggregato di materiale proteico con una componente significativa polisaccaridica (Bowen, C. E. et al.; 1996).

L' ostraco nello strato intermedio, composta da glicoproteine e aminoacidi specifici, che hanno la funzione di creare un reticolo ordinato per la cristallizzazione del carbonato di calcio, nella maggior parte dei casi in forma di aragonite e/o calcite (C. Pavat et al.;2012). Lo strato più interno e sottile, l'ipostraco, è composto da una sostanza madreperlacea .

### 1.1.2 Mantello

Il mantello è una membrana epitelio-connettivale sottile che si estende oltre l'apertura della conchiglia.

La parte dorsale del piede è a sua volta ricoperta da un doppio strato tegumentale detto mantello che si estende fino al bordo della parte prossimale della conchiglia.

Il bordo della tasca palleale del mantello sporge fuori dalla conchiglia.

Tale area dorsale è suddivisa in zone distinte istologicamente:

- Il lobo più esterno è delimitato da un epitelio semplice pavimentoso e cubico associato con il tessuto connettivo ricco di voluminose cellule a secrezione mucosa (Fig. 3);
- Il lobo mediano è caratterizzato da un epitelio semplice e pavimentoso, interrotto da una struttura globulare composta da svariate cellule cromofile;

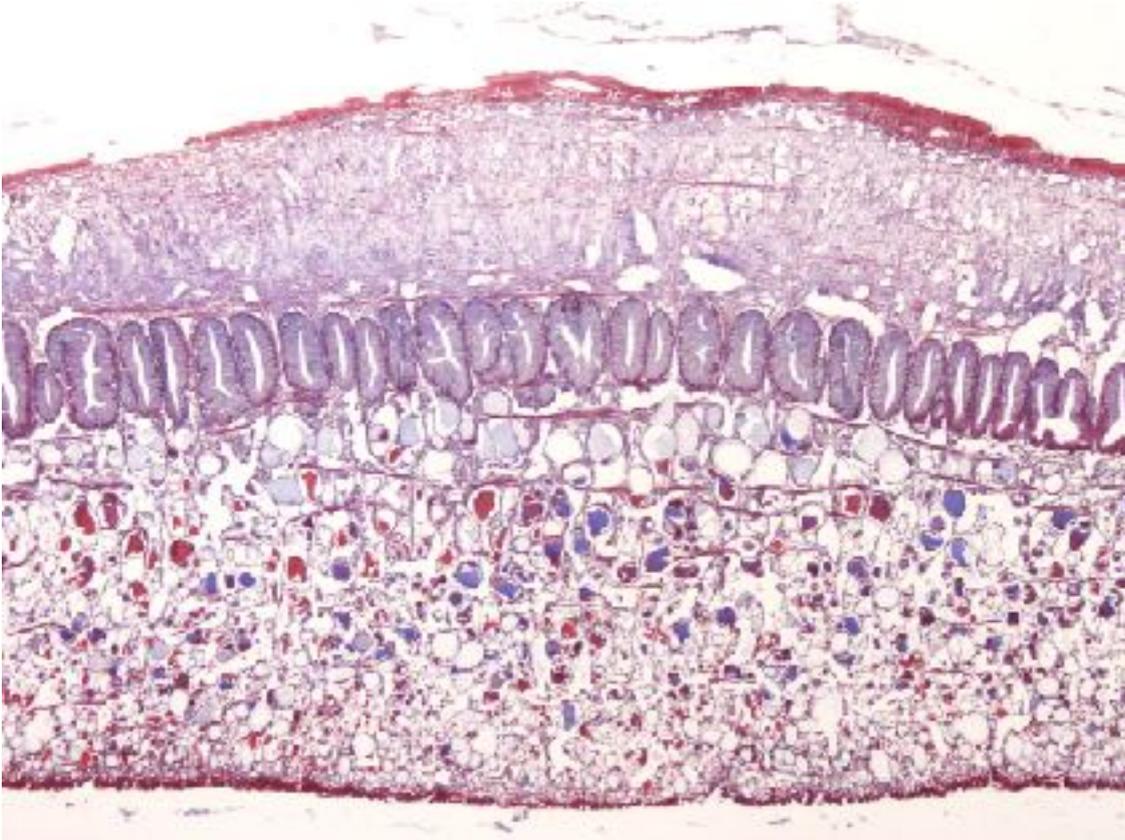


Fig. 3: Struttura cellulare del mantello di *Cornu aspersum*. 4X, Tricromica di Masson.

- Il lobo interno è costituito da un epitelio singolo e prismatico con ciglia ben sviluppate, supportato da tessuto connettivo denso contenente numerose fibre muscolari lisce e vasi emolinfatici (Fig. 3).

E' presente un dotto ghiandolare che percorre il lobo mediano e i lobi esterni, in cui sono presenti cellule epiteliali ghiandolari. Esse sono responsabili dell'accrescimento della conchiglia, mediante sintesi dei suoi componenti strutturali (Campion, 1961).

*C. aspersum* usa il pavimento muscolare della cavità del mantello per effettuare vari movimenti contrattili. La contrazione e il rilassamento di questi muscoli riguarda principalmente il riempimento della cavità palleale e l'assorbimento dell'ossigeno.

### 1.1.3 Piede

Caudalmente e dorsalmente, il piede è sormontato dall'intestino associato alle ghiandole salivari, sul lato destro della parte cefalica sono presenti strutture distali del sistema riproduttivo che sfociano in un orifizio genitale.

L'epitelio di rivestimento che copre il piede nella regione anteriore è composto da una superficie formata da un epitelio semplice cubico e colonnare, sostenuto da

tessuto connettivo denso contenente numerose fibre muscolari lisce. Lo strato più esterno del tegumento è tipicamente spesso con superficie reticolata e rugosa. Le cellule epiteliali situate nella parte a contatto con il substrato sono irregolari e rivestite da ciglia, poco sviluppate e irregolari, si osservano cellule ghiandolari profonde (Fig. 4). Nel piede è presente un canale sormontato da una struttura ghiandolare, la ghiandola pedale.

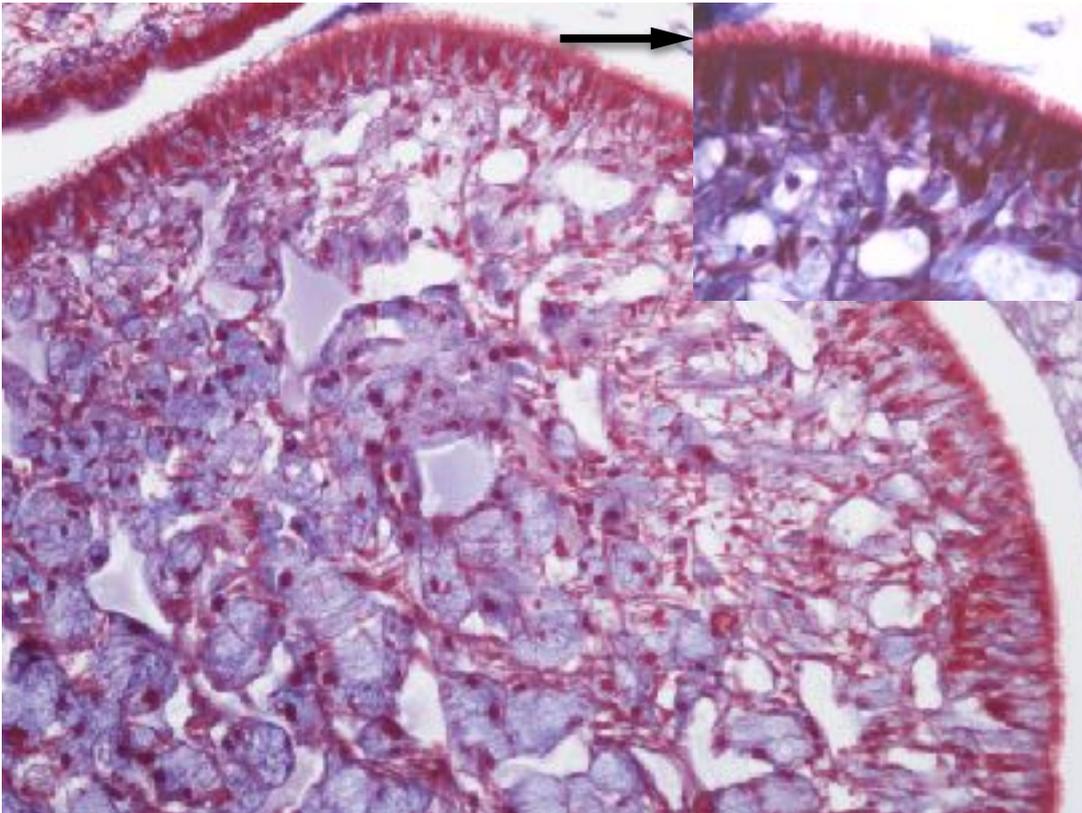


Fig. 4: Struttura cellulare del piede di *Cornu aspersum*. 20X, Tricromica di Masson. Riquadro in alto: dettaglio della struttura microvillare dell'epitelio 40X. Tricromica di Masson

La ghiandola pedale è composta da cellule grandi, con ampi nuclei circondati da citoplasma frequentemente vacuolizzato.

Le cellule ghiandolari, sparse ma relativamente numerose, sono visibili al centro del piede.

Esse mostrano caratteristiche istologiche simili a quelle delle cellule secernenti della ghiandola pedale (volume e nucleo grandi, citoplasma abbondante e cromofilo), il che suggerisce che esse potrebbero contribuire alla secrezione del muco. Il prodotto di secrezione delle cellule secernenti è convogliato verso il canale tramite dotti escretori.

Secondo Courty e Kierlik (2009), la ghiandola pedale è la fonte di una sostanza composta per il 97% di acqua e sali disciolti, e per il 3% da glicoproteine organizzate in una rete tridimensionale tramite legami tra gli atomi di zolfo. (Pawlicki et al., 2004). La consistenza ricorda quella di un gel elastico e permette al piede dell'animale di aderire al supporto sul quale si sposta. Gli studi effettuati su *H. pomatia*, *C. aspersum* e *D. reticulatum* (Lissman, 1945-46, citati da Jones, 1975; Jones, 1973) hanno evidenziato che durante la contrazione della muscolatura del piede, viene esercitata una forza disaccoppiante su questo gel, che provoca la rottura dei legami tra le proteine. I legami tra proteine vengono riformati in meno di un decimo di secondo, quando non vengono applicate più tali forze, ripristinando quelle che sono le proprietà adesive del muco.

La tissotropia che caratterizza il prodotto della ghiandola pedale appare come essenziale per la locomozione dell'animale.

#### 1.1.4 Tegumento e tipologie cellulari

Il tegumento è composto da un epitelio al quale è associato tessuto connettivo e fibre muscolari sub-epiteliali. L'epitelio è composto principalmente da un unico strato di due tipi di cellule a forma cuboide: cellule microvillose e cellule ciliate (Fig. 4).

Il termine 'tegumento' viene utilizzato piuttosto che 'parete del corpo' o 'pelle' per descrivere i tessuti che costituiscono la parete esterna dei gasteropodi terrestri, sia nell'area della testa, che in quella del mantello e del piede.

I tipi di cellulari che sono stati identificati, a vario livello, nei due gasteropodi terrestri presi in esame includono:

Cellule granulari, cellule pigmentate (melanociti), fibroblasti (fibrociti), cellule muscolari, cellule ghiandolari secernenti, cellule ghiandolari assorbenti, cellule del calcio, cellule nervose e processi, oltre che emociti.

Le cellule granulari sono caratterizzate da citoplasma che contiene granuli glicoproteici e talvolta sono così strettamente impilate che deformano i nuclei delle cellule stesse. La loro funzione non è chiaramente stabilita, oltre l'ovvia implicazione nella secrezione di specifiche glicoproteine. Un possibile ruolo neurosecretoriale è stato suggerito da Steinbach (1977).

I melanociti si trovano in tutto il tegumento e spesso sono più numerose nel mantello e nel piede. Queste cellule hanno forma irregolare, spesso si presentano con lunghi processi che si estendono tra altri elementi del tessuto connettivo.

I fibroblasti, chiamati anche "cellule indifferenziate", sono di dimensioni relativamente piccole, ampiamente distribuite, spesso con processi di ramificazione. Il nucleo è ricco di cromatina. Queste cellule sono implicate nella produzione di fibrille di collagene nel tessuto connettivo (Wondrak, 1969a).

Le funzioni dei tipi di cellule qui riassunti sono tutt'altro che ben compresi. Le cellule granulari sembrano avere ruoli secretori specifici ancora sconosciuti, e alle cellule del calcio e vescicolari sono state attribuite un'ampia varietà di funzioni, tra cui

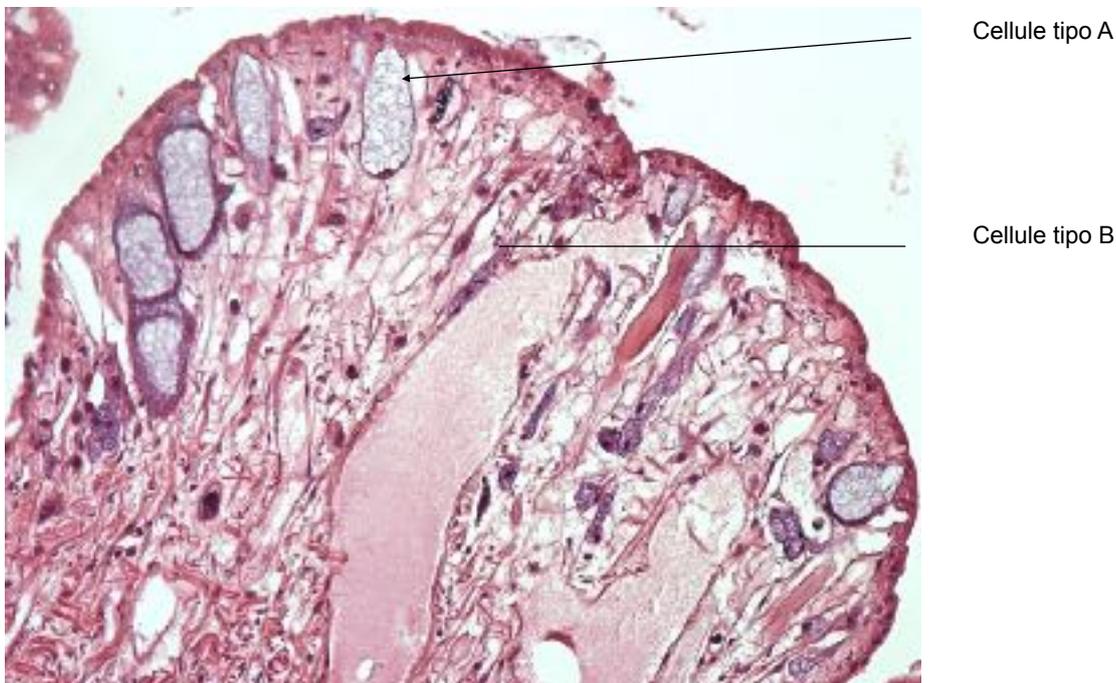


Fig. 5: Cellule ghiandolari secernenti di tipo A e B nell'epitelio della regione dorsale di *Cornu aspersum*, 20X. Ematossilina eosina .

supporto meccanico, deposito minerale e nutriente e disintossicazione.

In letteratura l'istologia dell'epitelio e delle cellule associate è stata ampiamente documentata da Campion (1961) la quale ha descritto i tipi di cellule secernenti nel tegumento nell'area dorso-ventrale dell'elicide *Cornu aspersum* (Müller).

Nel lavoro sono state descritte quattro tipologie diverse di cellule secernenti che hanno come prodotto: proteine, granuli di carbonato di calcio, globuli lipidici e

secrezioni pigmentate, nelle quali è presente flavone (considerato un prodotto di scarto).

In *C. aspersum* (Campion, 1961; Tonar and Markos, 2004), l'epitelio che circonda il piede, in posizione ventrale, contiene un singolo strato di cellule colonnari con

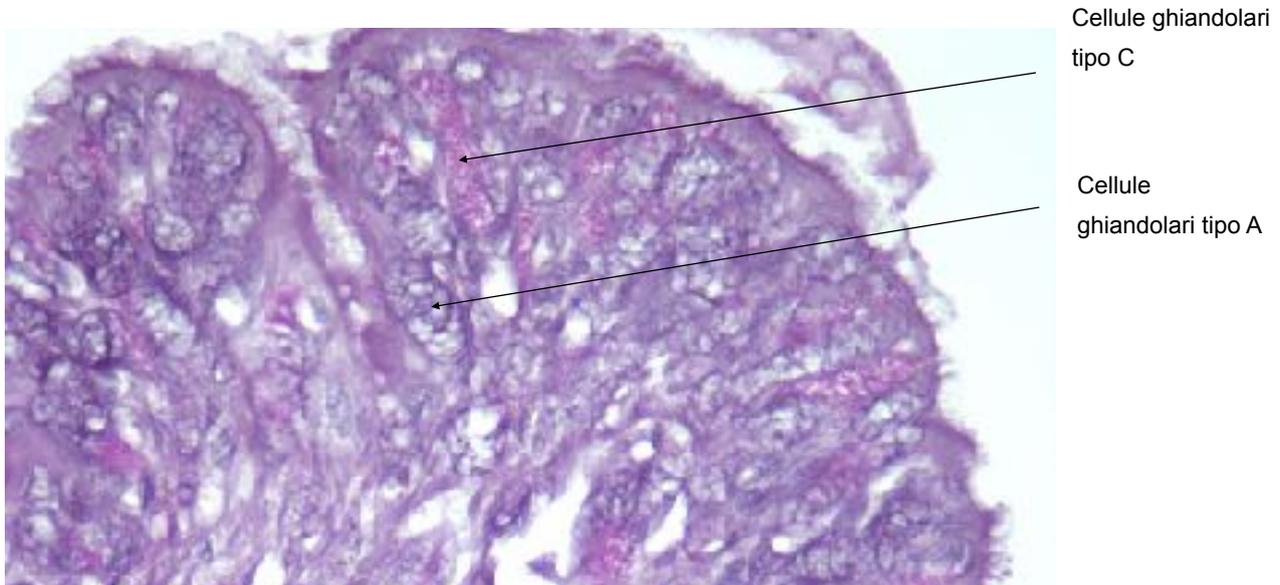


Fig. 6: Cellule ghiandolari secernenti di tipo A e C nell'epitelio della regione ventrale (piede) di *Cornu aspersum*, 40X, PAS.

spessore che varia tra i 25 e i 33  $\mu\text{m}$ ; (Campion, 1961).

Nella regione dorsale sono presenti due tipologie di cellule ghiandolari secernenti differenti : (i) cellule ghiandolari secernenti di tipo A con granuli 'bubbly-like' (Campion, 1961) (positive alle colorazioni istochimiche per Alcian blue, debolmente colorate con PAS) e, in numero minore, (ii) cellule ghiandolari secernenti di tipo B con materiale granulare omogeneo (Fig. 4) (Campion, 1961). Occasionalmente, sono state individuate, nell'epitelio della regione pedale, cellule del calcio (positive per la Von Kossa e Alizarin S red) (Campion, 1961).

Nella regione ventrale (piede) di *C. aspersum*, si possono evidenziare due tipologie cellule ghiandolari: (i) le cellule ghiandolari di tipo C, con granuli reticolari ben distinti (reazione positiva alla PAS, Fig. 6), occasionalmente, (ii) cellule ghiandolari di tipo D, con granuli simili a quelli del tipo C (Campion, 1961). Ad ogni modo, secondo l'autore, rimane in dubbio che le cellule ghiandolari di tipo D non siano che uno stadio di sviluppo del tipo C e non una ulteriore tipologia cellulare (Campion, 1961).

Nella zona di transizione tra la regione dorsale e quella ventrale sono presenti solo un tipo di cellule ghiandolari secretici (Tipo B) e tipologie di cellule non secernenti, ma che svolgono altre funzioni note (melanociti e cellule del calcio) (Campion, 1961).

Il tessuto connettivo costituisce una parte importante del tegumento, funge da supporto sostenendo lo strato di cellule epiteliali.

Comprende una matrice extracellulare di fibrille di collagene più o meno densamente intercalate e varie altre strutture cellulari.

Nei gastropodi gli emociti partecipano attivamente alle reazioni difensive delle cellule, come la fagocitosi (Tripp, 1970, Fryer e Bayne, 1996; Matricon- Gondran e Letocart, 1999), l'incapsulamento (Sminia et al., 1974, Harris e Cheng, Glinski e Jarosz, 1997), la neutralizzazione parassitaria (Drozdowski e Bikowska, 1994), nonché il processo di coagulazione e di rigenerazione cellulare (Sminia, 1981). Sulla base dei criteri morfologici Adamowicz distingue due tipi di emociti: tipo I e tipo II.

Su base morfologica la divisione di tali cellule avviene in due categorie: granulociti e ialinociti

Gli emociti di tipo I in *C. aspersum* corrispondono morfologicamente ai granulociti, e gli emociti di tipo II agli ialinociti.

Gli emociti di tipo II sono caratterizzati da un elevato rapporto nucleo citoplasma, capacità limitata di formare pseudopodi e diffondersi sul substrato.

Il numero di emociti circolanti varia tra e all'interno di specie, e dipende dai fattori ambientali (Adema et al., 1992).

Secondo Adamowicz Il numero di emociti in *C. aspersum* aumenta del 65% in autunno, a causa del contenuto dell'acqua inferiore nei tessuti e quindi della concentrazione, fattori che possono essere associati a esigenze fisiologiche in relazione ai cambiamenti climatici stagionali.

Nel complesso la percentuale di emociti di tipo I e II in *C. aspersum* nella popolazione totale di sangue è stata approssimativamente del 90% e del 10% rispettivamente in entrambe le stagioni (Adamowicz, 2003).

Brown nel 1967 in un suo esperimento iniettò *C. aspersum* con biossido di torio e osservò che gli emociti fagocitavano il materiale. Molti degli emociti carichi di torio migrarono poi attraverso le pareti degli organi riproduttivi (canale comune, vagina e pene), accumulati nei lumen dei canali per poi essere definitivamente eliminati sia attraverso la digestione intracellulare, sia attraverso l'espulsione fecale. Sono di forma generalmente sferica con pseudopodi irregolari e presenza di numerosi vacuoli nel citoplasma in posizione periferica che suggerisce un'attività endocitica. Oltre ai loro ruolo fagocitario, gli emociti sono implicati nella digestione e nel trasporto di molecole energetiche, ad esempio glicogeno (Wagge, 1955). Abolins-Krogis (1972), in *H. pomatia*, descrive le caratteristiche ultrastrutturali degli emociti coinvolti nella riparazione delle conchiglie. Queste cellule risultano in grado di veicolare le sostanze nutritive dalle cellule granulari alla ghiandola digerente per poi migrare nella zona del mantello dove si svolgono processi di riparazione. (D.L. Luchtel and I. Deyrup-Olsen, 1983).

### 1.1.5 Bocca e apparato radulare

In posizione anteriore, la testa contiene bocca in posizione ventrale, La mascella è la prima struttura incastonata in un'invaginazione dell'epitelio situata nella parte anteriore del cavo orale che è coinvolta nella frantumazione del cibo e prima elaborazione del cibo, essa è composta principalmente di scleroproteine, secrete dall'epitelio a esso associato.

La radula si presenta come un nastro di denti, disposti in file successive la cui struttura è supportata dal piano di espansione dell'epitelio associato alla bocca.

L'odontoforo, che fornisce ancoraggio alla radula, è associato ad un tessuto di supporto cartilagineo presente sia ventralmente che dorsalmente. L'azionamento dell'odontoforo da parte di una muscolatura specializzata è responsabile della proiezione in avanti dalla bocca, esso permette il posizionamento della radula a contatto con il substrato alimentare.

Quest'ultimo viene elaborato da una guaina radulare localizzata in posizione dorsale rispetto all'odontoforo.

La guaina radulare corrisponde ad una invaginazione dell'epitelio ventrale della cavità orale.

Nella parte inferiore di questa invaginazione sono presenti gli odontoblasti i quali hanno il compito di secernere nastro e denti.

Nella testa sono presenti due paia di tentacoli, i superiori, più lunghi, che hanno funzioni oculari, i due inferiori, più corti, che sono organi sensoriali chemiosensibili in grado di percepire variazioni di calore e stimoli chemiotattici (Chase, 1986a) (Fig. 8).

Tutto il complesso risulta essere fortemente innervato ed è sede del sistema nervoso centrale che è costituito da una coppia di gangli cerebrali e dalla massa sub-encefalica. Il sistema nervoso degli Stilommatophora è costituito da sei coppie di gangli: gangli cerebrali, bucali, pleurici, parietali, pedali, gangli singoli e viscerali.

### 1.1.6 Sistema nervoso

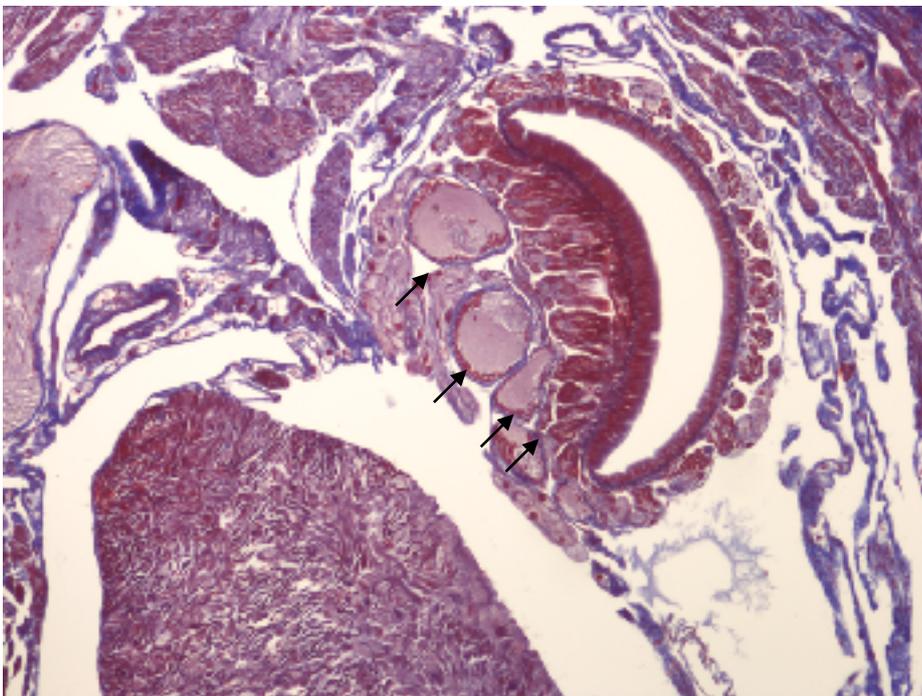


Fig. 7: Tentacolo inferiore sensoriale *C. aspersum*. La superficie interna è coperta da un complesso bordo microvillare, situato in posizione prossimale sul bordo terminale del tentacolo. Sono presenti gangli e cellule nervose associate (freccie). 10x Tricromica di Masson.

L'anatomia del sistema nervoso di *Cornu aspersum* è stata ampiamente studiata negli ultimi decenni.

Il complesso gangliare è diviso in varie proiezioni ramificate che divengono singoli fasci nervosi, che terminano in piccole strutture di senso situate tra le cellule epidermiche e la base del tentacolo. In profondità è presente un nervo connesso tra i gangli procerebrali e il ganglio cerebrale.

Il sistema nervoso centrale è circondato da un involucro di tessuto connettivo denso.

Chase definisce “cervello” il complesso di gangli associati, in quanto a livello funzionale i gangli ricevono input attraverso nervi periferici e nervi connettivi, le informazioni provengono dagli organi di senso e dalle cellule sensoriali distribuite di tutto il corpo, ma principalmente dalla regione testa (Chase, 1986a).

I gangli cerebrali integrano questa informazione sensoriale e producono comandi motori che vengono spesso indirizzati direttamente nei nervi periferici ad esempio nei centri periferici del ganglio pedale, buccale e viscerale.

A livello morfologico il complesso gangliare di *C. aspersum* è simile a quello di *H. pomatia* ed è diviso in tre lobi principali, il procerebrum per le funzioni olfattive e il mesocerebrum per le funzioni riproduttive ed è il comparto più differenziato, mentre il postcerebrum lo è molto meno (Fig.8) (Chase, 2000).

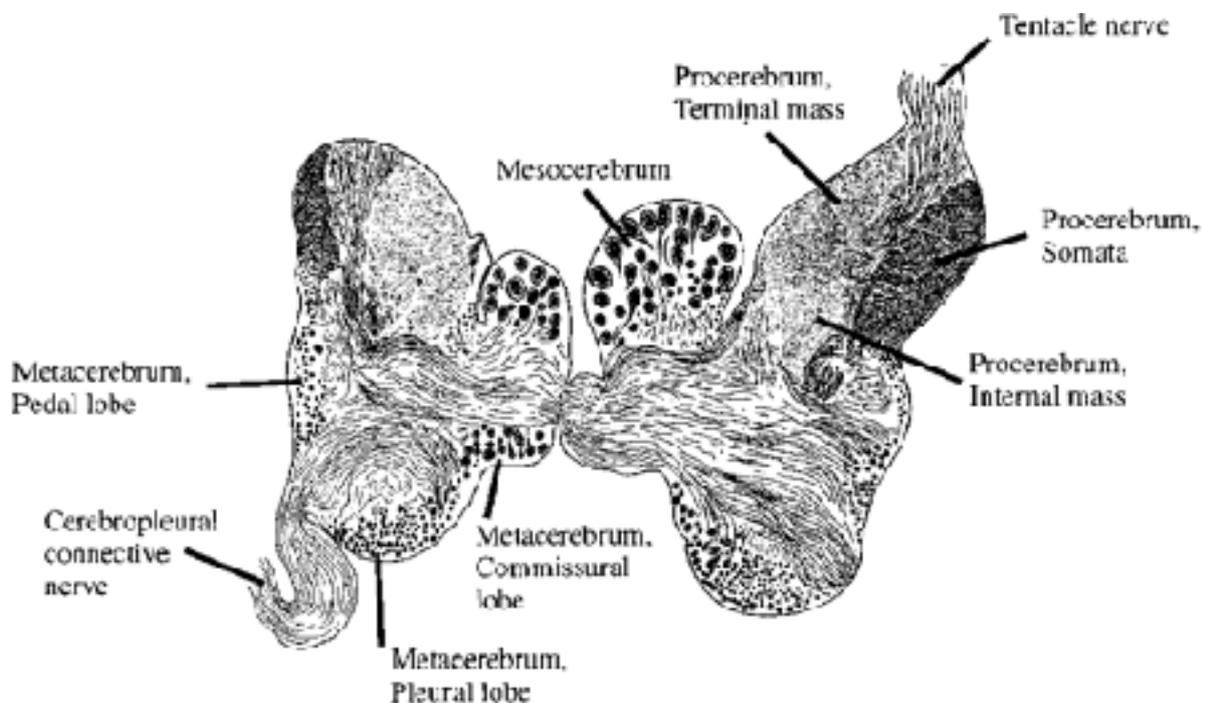


Fig. 8: Sezione orizzontale del complesso gangliare di *Helix pomatia*. Il procerebrum è composto da una regione somatica e due regioni neuropilari. Il mesocerebrum è più largo sul lato destro rispetto al lato sinistro. Il metacerebrum, sinonimo di postcerebrum, è diviso in tre lobi (Chase, 2000).

Le cellule mesocerebrali prevalentemente innervano il pene e il sacco del dardo in *Cornu aspersum* (Li e Chase, 1995).

In *Cornu aspersum* i neuroni hanno diametro che va da 100 a 150  $\mu\text{m}$  (Massobrio et al., 2013).

In generale tutti i molluschi gasteropodi terrestri non hanno alcun senso acustico e poca o nessuna capacità di riconoscere oggetti per mezzo della vista. La visione non è un senso importante nei gasteropodi terrestri perché sono attivi soprattutto durante la notte. Così, l'olfatto è la modalità principale. La maggior parte delle osservazioni sperimentali e la seguente descrizione si riferiscono ai tentacoli cefalici posteriori (Chase, 1986b; Chase e Tolloczko, 1993). Sono presenti organi olfattivi situati alle punte di ciascuno dei quattro tentacoli. Le molecole odorose rimangono trattenute nel fluido che ricopre questo epitelio. La contrazione del tentacolo aumenta in corrispondenza di odori più persistenti e più irritanti. Se le sostanze aeree disperse sono molto irritanti provocano un ispessimento del tessuto epiteliale e una maggior produzione di muco (Lemaire e Chase, 1998). Una caratteristica insolita dei tentacoli è la loro capacità di rigenerarsi dopo una lesione totale. (Chase e Kamil, 1983).

L'organo olfattivo è costituito da un epitelio specializzato situato in posizione prossimale all'occhio sulla bordo terminale del tentacolo (Fig. 7). La superficie esterna è coperta da un complesso bordo microvillare che può servire a proteggere le strutture sensoriali dall'essiccazione (Emery, 1992). Muovendosi verso l'interno, si trovano accanto lo strato di cellule epiteliali, poi fibre muscolari e gruppi di neuroni sensoriali bipolari. Queste cellule si rigenerano continuamente e risultano essere morfologicamente simili ai recettori olfattivi dei vertebrati (Chase and Rieling, 1986). I dendriti di queste cellule si estendono al bordo ciliare o microvillare, oppure in combinazione di entrambe cilia e microvilli (Emery, 1992). Esistono anche diversi tipi di cellule secreti all'interno dell'organo olfattivo (Chase e Tolloczko, 1985).

I percorsi neurali degli organi olfattivi al cervello sono sia diretti che indiretti (Chase e Tolloczko, 1993). Circa il 10% degli assoni dei neuroni sensoriali si reca direttamente al procerebrum. Altri assoni sensori terminano in glomeruli situati appena sotto l'epitelio sensoriale (Chase e Tolloczko, 1986). Altri terminano nel

ganglio situato alla punta dei tentacoli; qui essi presumibilmente creano sinapsi con le piccole cellule del ganglio, che a loro volta trasmettono i segnali al cervello attraverso fibre nervose. Una caratteristica insolita del ganglio associato al tentacolo riguarda l'ultrastruttura delle sinapsi. Circa un terzo delle sinapsi ha un'architettura simmetrica, il che indica un meccanismo di trasmissione bidirezionale (McCarragher e Chase, 1985).

Le labbra sono importanti strutture chemiosensoriali che mediano le risposte alle sostanze chimiche a contatto (Salánki e van Bay, 1976).

### 1.1.7 Ghiandole salivari

Le ghiandole salivari corrono parallelamente al sistema digestivo. Il prodotto della secrezione di tipo sierico-mucoso, ricca di enzimi digestivi, viene versato, attraverso due canali salivari, nella parte dorsale della cavità buccale. La bocca riceve secrezioni delle due ghiandole salivari contigue al tratto digerente anteriore.

Le ghiandole hanno molteplici funzioni, tra cui la lubrificazione e l'agglutinazione degli alimenti.

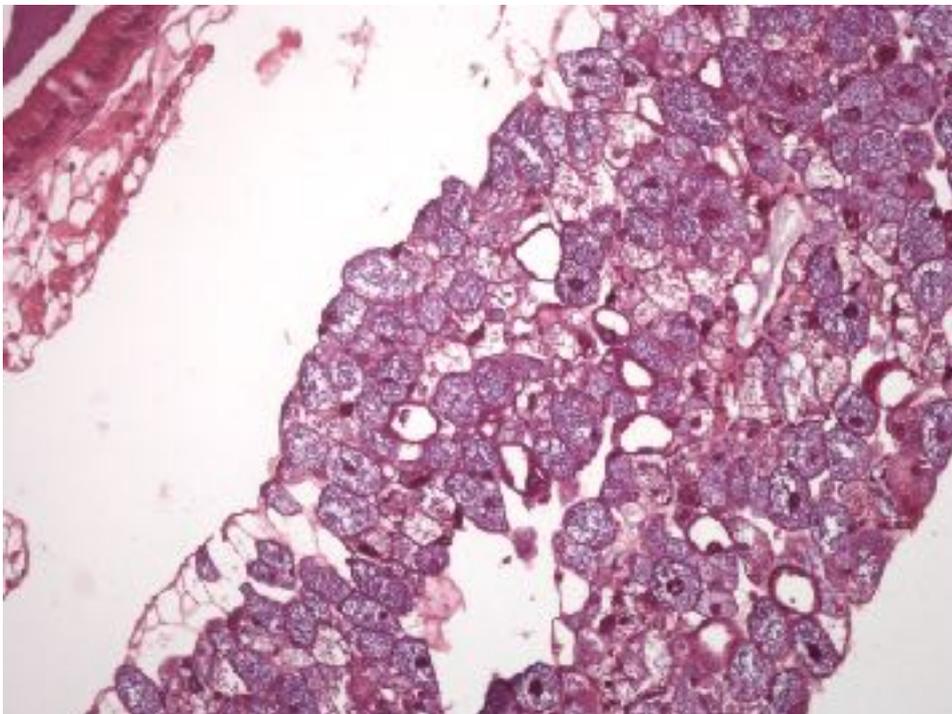


Fig. 9: Struttura cellulare della ghiandola salivare in *C. aspersum*, ingrandimento 20X, Ematossilina/eosina.

Le cellule che costituiscono il parenchima ghiandolare hanno forma e struttura molto diverse. Una sezione di parenchima mostra cellule irregolare poligonale con angoli arrotondati, ciascuna impilata contro le altre, ma isolata da una membrana sottile e priva di interstiti connettivi e spugnosi (Fig.9).

Le ghiandole salivari appaiono costituite da due tipi principali di cellule:

Le cellule mucose e le cellule sierose.

Le prime producono mucopolisaccaridi e le seconde proteine enzimatiche. Questi prodotti secreti sono convogliati nei canali prossimali che hanno funzione di trasporto. Una volta arrivati a contatto con le particelle alimentari abrase dal complesso radulare, avviene la digestione enzimatica e l'agglutinazione ad opera del muco (Serrano T. et al., 1996).

### 1.1.8 Massa viscerale

La cavità orale comunica con il tratto gastrointestinale che consiste in una successione di esofago, stomaco, intestino e retto aperti all'esterno attraverso l'ano. La regione centrale del tratto digestivo prende il nome di gozzo. In posizione dorsale è presente il polmone, sede degli scambi gassosi, il quale sovrasta la massa viscerale, che contiene il rene o organo del Bojanus, il cuore (composto da un atrio e un ventricolo), il complesso intestinale (strettamente associato alla ghiandola digerente) , nonché dalla maggior parte del tratto riproduttivo con ovotestis, condotto ermafrodita, ghiandola dell'albume insieme allo spermidotto e ovidotto.

A differenza del rivestimento epiteliale del piede o della regione anteriore, il rivestimento epiteliale della massa viscerale è un epitelio pavimentoso semplice, sostenuto da tessuto connettivo lasso in cui sono presenti fibre muscolari lisce e vasi emolinfatici.

### 1.1.9 Ghiandola digerente

La ghiandola digerente occupa la maggior parte del volume della massa viscerale. Si compone di due lobi, ognuno collegato al mesentere da un canale digerente. Essa viene chiamata, in alcune pubblicazioni, erroneamente "epatopancreas", in realtà la sua funzione non è né epatica né pancreatica.

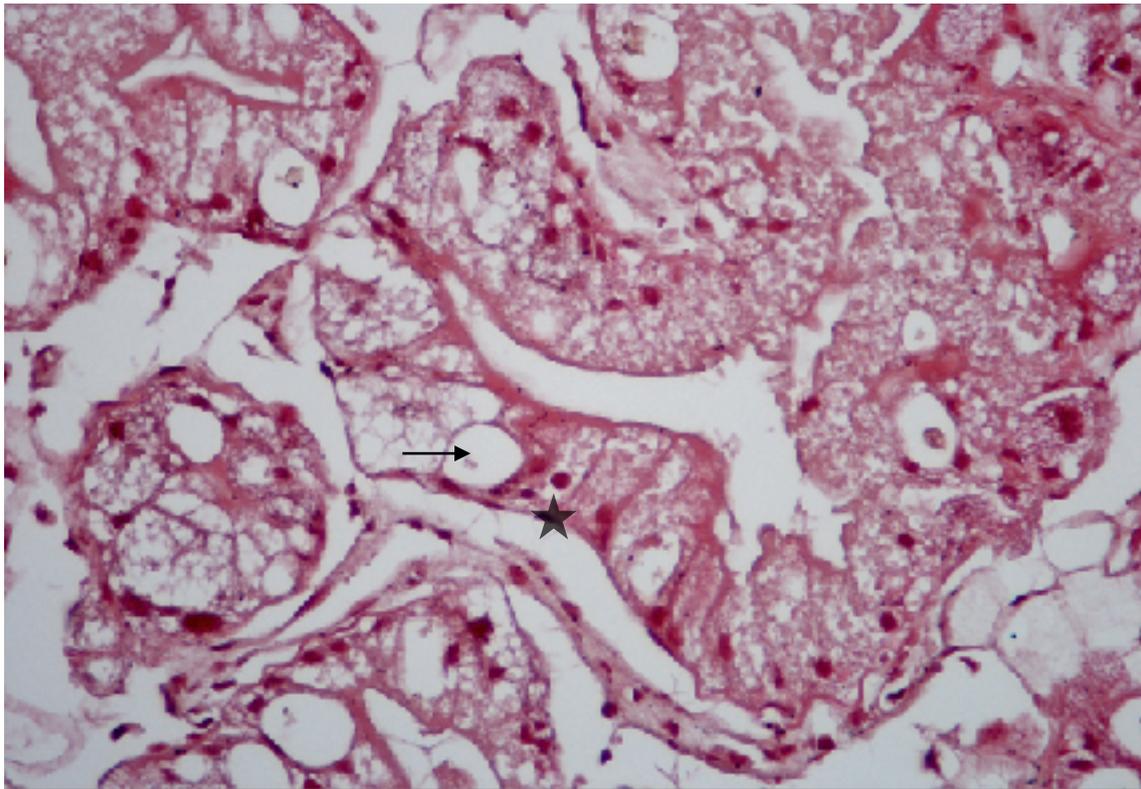


Fig. 10: Cellule della ghiandola digerente in *Cornu aspersum*: cellule secernenti, freccia; cellule assorbenti, stella. 40x Ematossilina/eosina.

Essa corrisponde ad un prolungamento del gozzo e presumibilmente la sua evoluzione è in relazione all'aumento della superficie di assorbimento di tutto il tratto deputato alla digestione. Il canale digerente e le loro ramificazioni sono rivestite da un epitelio semplice, prismatico e ciliato sostenuto da tessuto connettivo in cui sono intercalate delle fibre muscolari lisce.

Le particelle alimentari sono convogliate dal canale digestivo verso i tubuli da un movimento di ciglia delle cellule epiteliali apicali, residui della digestione usando lo stesso percorso in senso inverso.

I tubuli sono il sito di digestione extracellulare e intracellulare delle particelle di cibo. I lobi delle ghiandola digerente sono circondati da tessuto connettivo associato ad alcune fibre muscolari lisce, il tutto racchiuso in un involucro.

Essi appaiono formati dalla giustapposizione di numerosi tubuli, gli spazi tra loro sono riempiti da tessuto connettivo in cui circola l'emolinfa.

Il lume del tubulo digerente è rivestito da un epitelio semplice associato a diversi tipi di cellule ed è in continuità con quelle dei canali di diametro minore.



### 1.1.10 Intestino

L'intestino si presenta come un tubo di diametro costante, la cui parete è localmente invaginata a formare pieghe (Fig. 12).

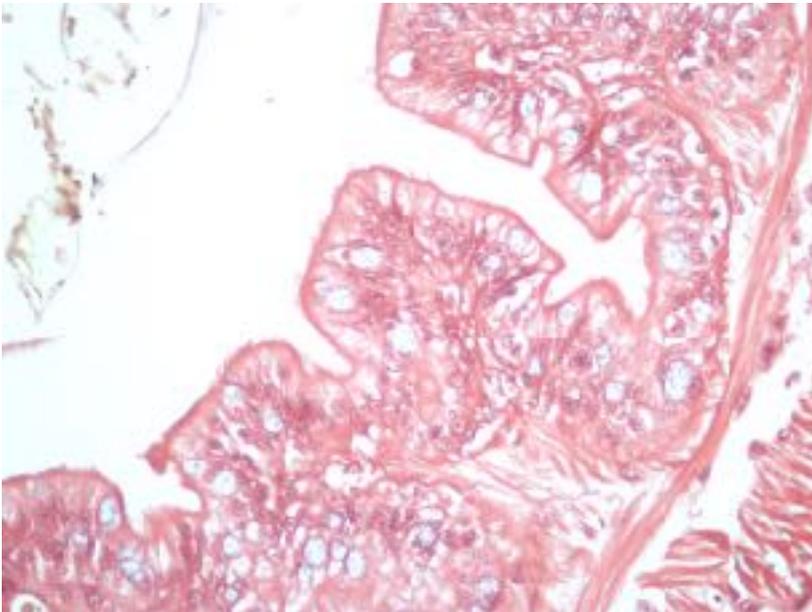


Fig. 12: Struttura istologica dell'intestino di *C. aspersum*, 40X ,  
Ematossilina/eosina.

Esso è formato da un epitelio semplice di rivestimento in cui si alternano cellule ciliate e cellule ghiandolari, un sottile strato di tessuto connettivo e uno strato di fibre muscolari lisce poco sviluppate.

La struttura istologica dell'intestino è poco diversa da quella dello stomaco.

Lo stesso vale per l'esofago, il quale si presenta come un tubo cilindrico diritto che si dilata in una grande tasca distale, la cui parete è costituita da un epitelio cubico semplice che si posa su di un sottile strato di tessuto connettivo, intorno al quale sono presenti fibre muscolari lisce.

Dal punto di vista funzionale, la porzione tubolare dell'esofago trasporta le particelle di cibo attraverso il battito delle ciglia verso il gozzo dove si accumulano facendo iniziare la prima fase del processo digestivo. Lo stomaco è a sua volta sede di un processo meccanico di elaborazione delle particelle di cibo il tutto coadiuvato da un processo di chemiosintesi ad opera della flora batterica enterica, mentre l'intestino sembra avere un ruolo, limitato al processo di assorbimento e riassorbimento oltre che funzione di modellazione delle feci.

Parlapani et al. (2014) in uno studio effettuato sia su chioccioline selvatiche e trasformate (*C. aspersum*, *Helix lucorum*) sia su chioccioline allevate (*C. aspersum*) da aziende agricole indoor/outdoor evidenziò la presenza di *Salmonella spp.* solo nei tessuti e nell'intestino di chioccioline selvatiche.

I tessuti e l'intestino in *Cornu aspersum* sia in condizioni naturali che in allevamento contengono un'elevata concentrazione di vari microrganismi come i batteri enterici. Nelle chioccioline allevate sono state trovate concentrazioni più basse di batteri quali *Escherichia coli* ed *Enterococcus spp.* rispetto alle selvatiche (Parlapani, 2014).

Charrier et al. (2006) identificò solo una specie di *Clostridium* in *C. aspersum*, in un altro lavoro invece è stata riscontrata la presenza di *Pseudomonas aeruginosa*, ed *Enterobacter*, che possono presentare un rischio sia per la vitalità delle chioccioline, che per il benessere dei consumatori finali (Adagbada et al., 2011). Ci sono dati che supportano l'ipotesi che l'elevato numero di batteri del genere *Aeromonas* durante l'ibernazione è causa di una elevata mortalità delle chioccioline allevate nelle aziende francesi (Kiebre-Toe et al., 2005). È possibile che lo sviluppo di antagonisti di tali batteri, nel tratto intestinale, alterino la composizione della microflora intestinale durante l'ibernazione. È quindi possibile che tali fluttuazioni climatiche siano cruciali per il loro sviluppo, come dimostrato da Koleva et al. 2015, il quale suggerisce che la composizione della comunità batterica nel tratto intestinale di *C. aspersum* è influenzata da variazioni stagionali e ambientali e risponde con cambiamenti nella sua composizione e struttura.

### 1.1.11 Cavità polmonare

La cavità polmonare, situata in posizione dorsale e anteriore rispetto alla massa viscerale, si trova nella conchiglia che funge da protezione. L'opercolo è assente negli Stylommatophora, anche in fase embrionale. Nella parte più interna è presente una cavità detta palleale sede degli scambi respiratori (Sommerville, 1973). La cavità polmonare è ampia e delimitata dorsalmente da tessuto connettivo e fibre muscolari. Il polmone è un organo il cui la parte superiore è costituita da una inflessione nell'epidermide e quella inferiore dall'involucro della massa viscerale.

La cavità polmonare, così delimitata, comunica con l'ambiente esterno attraverso un' apertura, il pneumostoma. La ventilazione, comporta un abbassamento del piano basale del polmone a causa della contrazione della muscolatura parietale mentre il pneumostoma viene aperto, causando una depressione con conseguente ispirazione dell'aria dall'esterno (Sommerville, 1973). Il rilascio della muscolatura parietale, mentre pneumostoma è chiuso, è responsabile del sollevamento della parete basale del polmone e un aumento della pressione nella cavità polmonare(Sommerville, 1973). Con l'apertura del pneumostoma l'aria viene espulsa a causa di questa pressione(Sommerville, 1973).

La cavità polmonare dei Gasteropodi polmonari qui descritto è una neoformazione, risultante da un'invaginazione secondaria dell'epidermide, e quindi non è omologa alla cavità del mantello di altri molluschi. L' epitelio respiratorio, è anch'esso associato a fibre di tessuto connettivo e muscolare. La superficie respiratoria è formata da un epitelio semplice e pavimentoso confinante con la cavità polmonare. E 'supportato da un tessuto connettivo denso in cui si osservano cellule ghiandolari. Nell'area sotto l'epitelio respiratorio si trovano diversi vasi emolinfatici, a parete sottile, composti da fibre di tessuto connettivo, alcuni fibrociti e fibre muscolari lisce. Ancora più in profondità sono presenti abbondanti fibre muscolari.

### 1.1.12 Apparato cardio-renale

Il cuore si trova in una posizione posteriore sopra la massa viscerale, vicino alla parte posteriore rene e polmone. E' racchiuso in un pericardio che delimita una cavità pericardica, di origine celomatica.

Esso è composto da un atrio, che riceve l' emolinfa della vena polmonare e da un ventricolo, che pompa l emolinfa nell'aorta situata in posizione anteriore che alimenta la regione della testa e una posteriore che si dirama nella massa viscerale.

Atrio e ventricolo sono in comunicazione attraverso una valvola atrio-ventricolare (Fig. 13). Questo dispositivo impedisce il reflusso di emolinfa nell'atrio durante la sistole ventricolare.

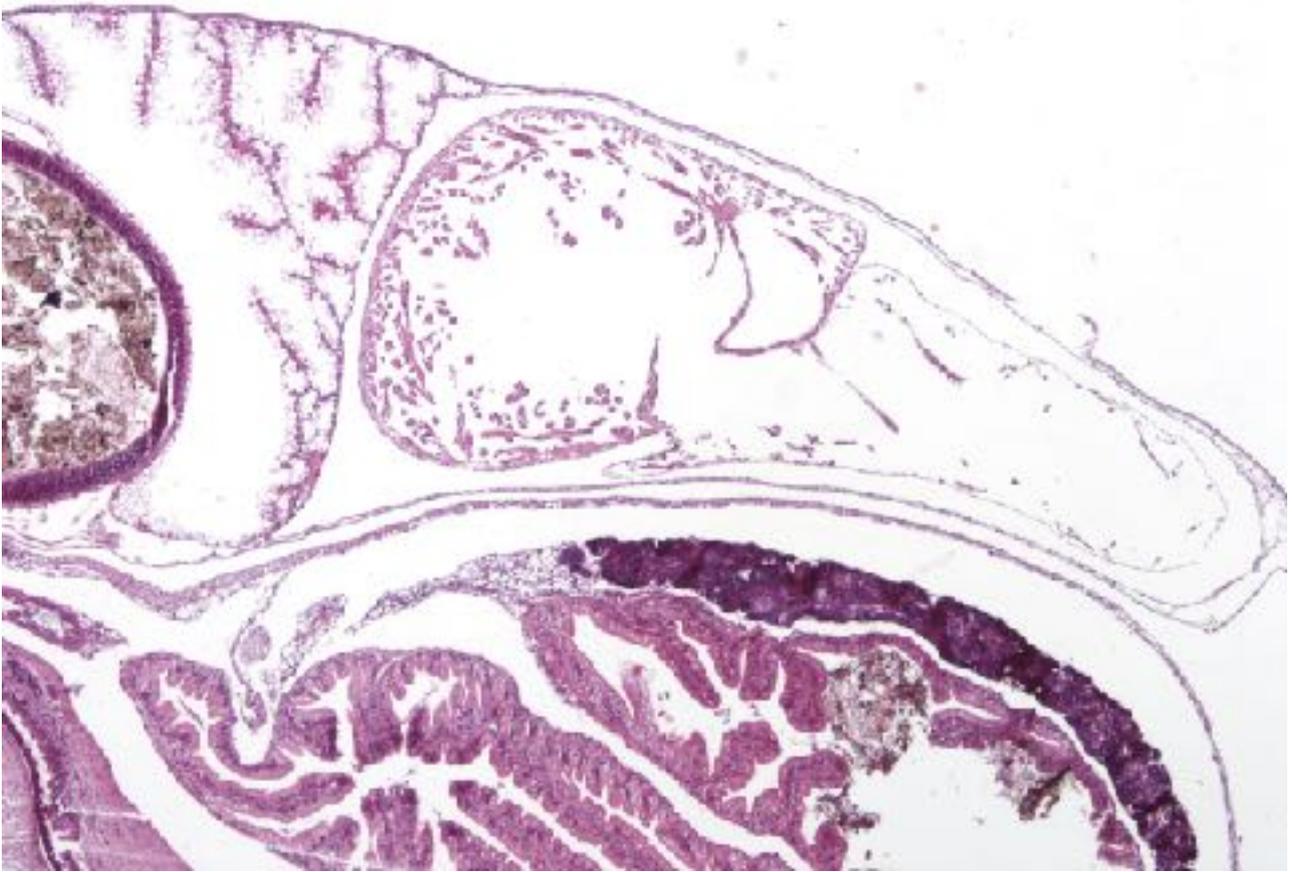


Fig. 13: Apparato cardio-renale in *Cornu aspersum*: cavità pericardica, atrio, ventricolo rene, valvola atrio/ventricolare. 10X Ematossilina/eosina

Dalla periferia verso l'interno, la parete dell'atrio è formata:

- Epicardio, epitelio semplice cubico e corrispondente al foglietto viscerale del pericardio;
- Tessuto connettivo lasso;
- Fibre muscolari, alcune delle quali appaiono striate (miocardio);

Come per l'atrio, allo stesso modo, la parete del ventricolo è composta da quattro strati

Dalla periferia verso l'interno:

- Epicardio ;
- Tessuto connettivo ;
- Miocardio ;
- Epitelio di rivestimento interno .

Spinta dalla contrazione del ventricolo, l'emolinfa viene convogliata attraverso le arterie in tutto il corpo, dalle aorte e le loro ramificazioni. In periferia, la rete di arterie scarica il flusso emolinfatico nelle lacune del tessuto connettivo. Il ciclo si chiude con un sistema di vene efferenti che convergono in una vena polmonare che trasporterà l'emolinfa al cuore (Sommerville, 1973).

La circolazione di emolinfa è organizzata in modo unidirezionale .

L'emolinfa che circola irriga i vari organi e poi viene versato nel celoma per poi ritornare al cuore attraverso le vene dopo aver subito una riossigenizzazione del sangue nel polmone.

La vena polmonare mostra un'espansione ritmica e una contrazione, raggiungendo il suo più grande diametro appena prima della diastole massima del ventricolo. Questa pulsazione risulta più marcata quando il pneumostoma è aperto (Sommerville, 1973)

Il pericardio che circonda il cuore si trova sotto l'epidermide e il tessuto connettivo sottostante.

Quest'ultimo è associato con fibre muscolari lisce a vario orientamento, e contiene vasi emolinfatici ben sviluppati.

Il pericardio appare composto da due epiteli semplice cubici, un epitelio parietale e un epicardio situato in contatto a miocardio.

Essi insieme definiscono la cavità pericardica .

Esso definisce due compartimenti all'interno del sistema circolatorio :

-Un compartimento "Post-polmonare" che garantisce la distribuzione dell'emolinfa, liberandosi delle sostanze di rifiuto;

-Un compartimento "Pre-polmonare" responsabile del drenaggio dell'emolinfa povera d'ossigeno ma ricca di scarti.

Atrio e ventricolo sono delimitati da pareti sottili e spesse , rispettivamente. In entrambi i casi, appaiono principalmente costituite da tessuto muscolare di tipo miocardico.

Nel ventricolo, il miocardio è organizzato in raggi periferici associati con la parete profonda e sporgenti nel lume .

Le due camere sono in comunicazione , da una valvola atrio-ventricolare contrattile, come una valvola di non ritorno, che impedisce, appunto, il ritorno dell'emolinfa nell'atrio.

La posizione della valvola indica che quando si chiude occluderà l'aorta posteriore in modo che l'emolinfa non possa entrare in tale vaso durante la sistole ventricolare, ma può entrare solo come riflusso dall'aorta anteriore durante la diastole ventricolare (Sommerville 1973).

In *C. aspersum* una seconda valvola semilunare è stata trovata nell'aorta anteriore appena dopo il punto in cui attraversa il dotto spermatico nell'emocele viscerale.

Il volume totale del cuore varia con lo stato di attività dell'animale e anche quella parte del pericardio è sempre in contatto con l'aria nella cavità del mantello (Sommerville, 1973).

Il tasso e la regolarità del battito cardiaco variano durante il ciclo di respirazione, risultano lenti e irregolari quando il pneumostoma è chiuso e veloci e regolari quando è aperto (Sommerville, 1973).

L'osservazione del cuore intatto di *C. aspersum* ha mostrato variazioni nel grado di riempimento indicando un aumento del flusso emolinfatico dall'emocele alle vene polmonari e al cuore quando il pavimento della cavità del mantello è depresso. Il volume totale del cuore e della cavità pericardica risulta maggiore in fase di diastole ventricolare rispetto alla sistole (Sommerville, 1973).

Lo sviluppo del miocardio è molto più abbondante nel ventricolo piuttosto che nell'atrio.

Le fibre muscolari striate sono abbondanti, i fasci in profondità sono organizzati in una matrice, e i fasci superficiali hanno una disposizione trasversale .

Il rene o l'organo di Bojanus, è situato vicino al cuore, da cui è indipendente e garantisce l'escrezione. Viene drenato da un canale renale che corre parallelo al retto e si apre a destra dell'ano.

Il rene è situato dorsalmente, in posizione posteriore, sulla superficie della massa viscerale.

La parete del rene è estesa e formata da numerose pieghe, sono presenti assi connettivali di sostegno in cui sono presenti lacune emolinfatiche. Queste pieghe sono rivestite da un epitelio semplice, cellule di forma prismatica simili tra loro che prendono il nome di nefrociti.

È collegato da un lato con la cavità pericardica da un orifizio reno-pericardico, e con un uretere che convoglia il prodotto di rifiuto.

L'uretere è attaccato al rene per una parte della sua lunghezza. Il lume è circondato da una parete , più o meno ripiegata, costituita da un epitelio semplice, prismatico e cubico, sormontato da un epitelio di congiunzione (parenchima) ricco di lacune

emolinfatice. L'epitelio renale è composto da nefrociti, cellule alte, con una marcata polarità: hanno nucleo basale associato con un citoplasma cromofilo, mentre la regione apicale è occupata da un vacuolo di grosse dimensioni contenente concrezioni di acido urico, guanina e concrezioni di xantina, consentendo quindi la rimozione dell'azoto con riduzione della perdita di acqua (Riddle, 1983).

La produzione di urina avviene all'interno dei nefrociti, i quali operano una

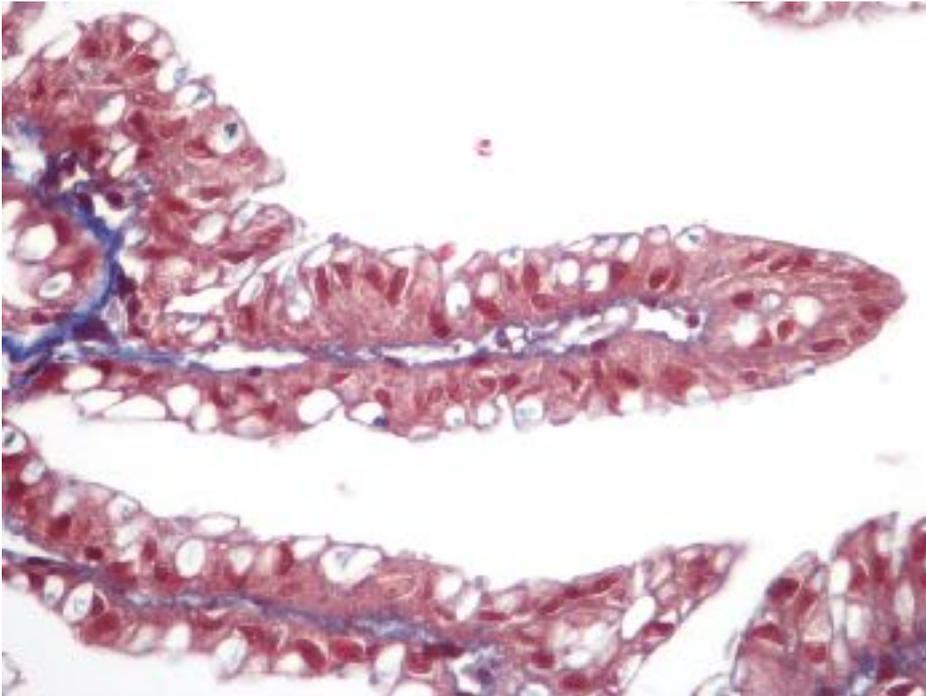


Fig. 14: Papille renali in *Cornu aspersum*. Visibile l'asse connettivale in blu e la tipica struttura ad acini contenenti concrezioni di acido urico. 40X, Tricromia di Masson.

ultrafiltrazione dell'emolinfa che fluisce attraverso le lacune e gli assi connettivali o lamelle che supportano le pliche della parete renale (Vorwohl, 1961; Martin et al., 1965). Tali strutture sono i principali responsabili della produzione di concrezioni molecolari che vengono raccolte dall'emolinfa. Questi depositi si accumulano in strati concentrici di acido urico e lipidi intorno ad un nucleo di calcio, e si sviluppano all'interno dei vacuoli. Queste concrezioni vengono espulse nel lume del rene. L'urina primitiva prodotta dal rene è isoosmotica rispetto all'emolinfa, ed è condotta attraverso l'uretere. Questi animali conservano spesso l'urina nella cavità palliale, che presumibilmente ha la funzione di serbatoio d'acqua (Blinn, 1964, Smith, 1981) per successivo riassorbimento dal sistema renale.

La parete del condotto forma pieghe più o meno sviluppate nella regione più prossimale.

Essa è in contatto con il lume del rene e presenta un epitelio semplice cubico, provvisto di cellule ciliate in posizione apicale. L'epitelio giace sul tessuto connettivo associato con scarse fibre muscolari lisce. La polarità delle cellule epiteliali è più marcata. Mostrano una marcata striatura basale, dimostrando l'esistenza di pieghe sulla membrana basale alla quale sono associati dei mitocondri. Il nucleo è in posizione apicale citoplasma è cromofilo. Tali caratteristiche possono essere messe in relazione con la necessità di effettuare degli scambi tra queste cellule, tra emolinfa l'uretere e urina. Essi sono la sede del riassorbimento di carboidrati, aminoacidi, elettroliti e acqua e secrezioni derivanti da processi implicati nel consumo di energia. L'urina in questa fase è di tipo ipoosmotico rispetto all'emolinfa. La composizione dell'urina originale viene modificata a causa del passaggio attraverso l'uretere a causa dell'attività delle cellule epiteliali. Essa viene successivamente convertita in urina finale (matura) e rimossa dall'animale in corrispondenza dell'orifizio escretore. La parte dell'uretere coinvolta nella formazione dell'urina finale è indicata con il termine di "uretere primario" o "tasca nefridiale", mentre la parte che porta l'urina all'orifizio escretore, in cui sono limitati i processi di riassorbimento e secrezione, è chiamata "uretere secondario." (Serrano T. et al., 1996)

### 1. 1.13 Apparato riproduttore



Fig. 15: Dardo in *Cornu aspersum*

*Cornu aspersum* come *Theba pisana* è un ermafrodita reciproco simultaneo. Tale specie raggiunge la piena maturità sessuale in 4-7 mesi (Szkucik K, et al, 2011).



Fig. 16: Due esemplari di *Cornu aspersum* in fase di accoppiamento

In questa specie entrambi i membri si accoppiano simultaneamente sia come maschi che come femmine (Adamo & Chase 1988, Chase & Vaga, 2006).

Tutti gli organi genitali si aprono in un atrio che comunica con l'esterno attraverso un poro genitale. L'accoppiamento si verifica quando si opera l'estroffessione del pene e la penetrazione del partner attraverso i pori genitali (Fig 16). Quando gli spermatozoi sono maturi, vengono trasferiti al partner. In *Helix pomatia*, come descrive Lind, lo sperma viene trasferito in una spermateca. Verso la fine del corteggiamento, ogni animale cerca di colpire l'altro con un dardo affilato e calcareo (Fig.15) (Chase R. and Blanchard, 2006).

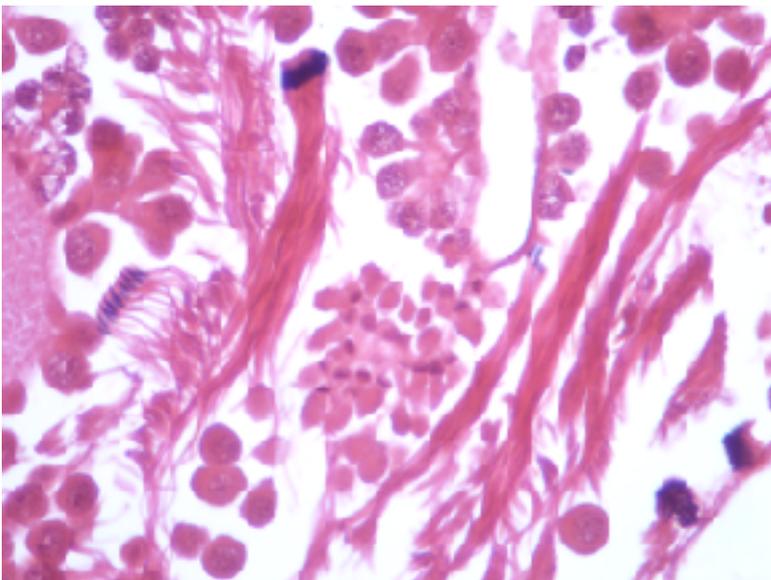


Fig. 17: Sezione istologica in Ematossilina/eosina di un'ovotestis di *Cornu aspersum*. Si possono notare gli spermatozoi e gli ovuli in fase di sviluppo. Ematossilin/eosina ,40X.

L'emissione avviene in modo rapido, a volte producendo risultati drammatici (morte di uno dei partner). Tuttavia, in circa la metà di tutte le emissioni, il dardo manca completamente il suo target bersaglio o colpisce solo di striscio, dopo di che cade al suolo (Chase R. and Blanchard, 2006).

È stato notato il successo dei colpi a segno non influenzano né la probabilità che il corteggiamento culminerà nella copulazione né la dimensione della donazione di spermatozoi in seguito (Adamo & Chase, 1988, Chase & Vaga 2006). La capacità di ovideposizione multipla dei gasteropodi terrestri è uno dei meccanismi aggiuntivi per incrementare il loro successo riproduttivo. *Theba pisana* è stata trovata a deporre dalle 11 alle 46 volte l'anno con un totale di uova prodotte che supera le 4.500 (Baker, 1991).

Il processo di spermiogenesi comprende tutti quei cambiamenti dello sviluppo, sia morfologici che citochimici, che trasformano gli spermatidi in spermatozoo.

La spermiogenesi è stata riscontrata durante tutta l'estate.

In uno studio effettuato da Bloch e Hew (1960) si sottolinea che la transizione del nucleo dello spermatozoo di *C. aspersum* da un istone ricco di arginina ad una protamina si verifica all'interno del condotto ermafroditico.

Gli spermatozoi così formati vengono rilasciati dal condotto ermafroditico e vengono condotti attraverso lo spermovidotto e l'ovidotto verso la bursa copulatrix, dove vengono digeriti. Le due scanalature dello spermovidotto sono separate funzionalmente solo per pochi minuti prima dell'effettiva copulazione, gli spermatozoi vengono condotti agli organi di copulazione dove si forma lo spermatoforo (Hans Lind, 2009).

L'ovotestis di *C. aspersum* adulta è composta da un gran numero di tubuli (acini) collegati ad un dotto ermafroditico. Questi tubuli contengono sia cellule maschili che femminili (Fig. 17).

Le cellule della linea germinale femminile si trovano all'interno dell'epitelio germinale.

Le cellule femminili in fase immatura si trovano nella zona prossimale degli acini.

### 1.1.14 Ghiandole sessuali accessorie

Ghiandole sessuali accessorie: ghiandola prostatica, ghiandola dell'albume, vescicola seminale (Fig. 18).

La ghiandola dell'albume è una ghiandola esocrina, compatta, ramificata, costituita da unità di secrezione tubulare. Si tratta di un organo tubulare composto da cellule cubiche e cellule secretici che formano grandi globuli PAS-positivi (Fig. 19).

I tubuli di secrezione hanno un lume ridotto. Sono coperti da cellule alte, piramidali, con nuclei sferici e basali.

La funzione di questa ghiandola nei molluschi gasteropodi è nota. Nel 1938 Baldwin e Bell hanno mostrato che la ghiandola dell'albume di *H. pomatia* secerneva un polimero di galattosio complesso che è stato definito come "galattogeno" in quanto produce galattosio per idrolisi. Tale molecola risulta essere necessaria per la formazione del rivestimento delle uova, prima della formazione

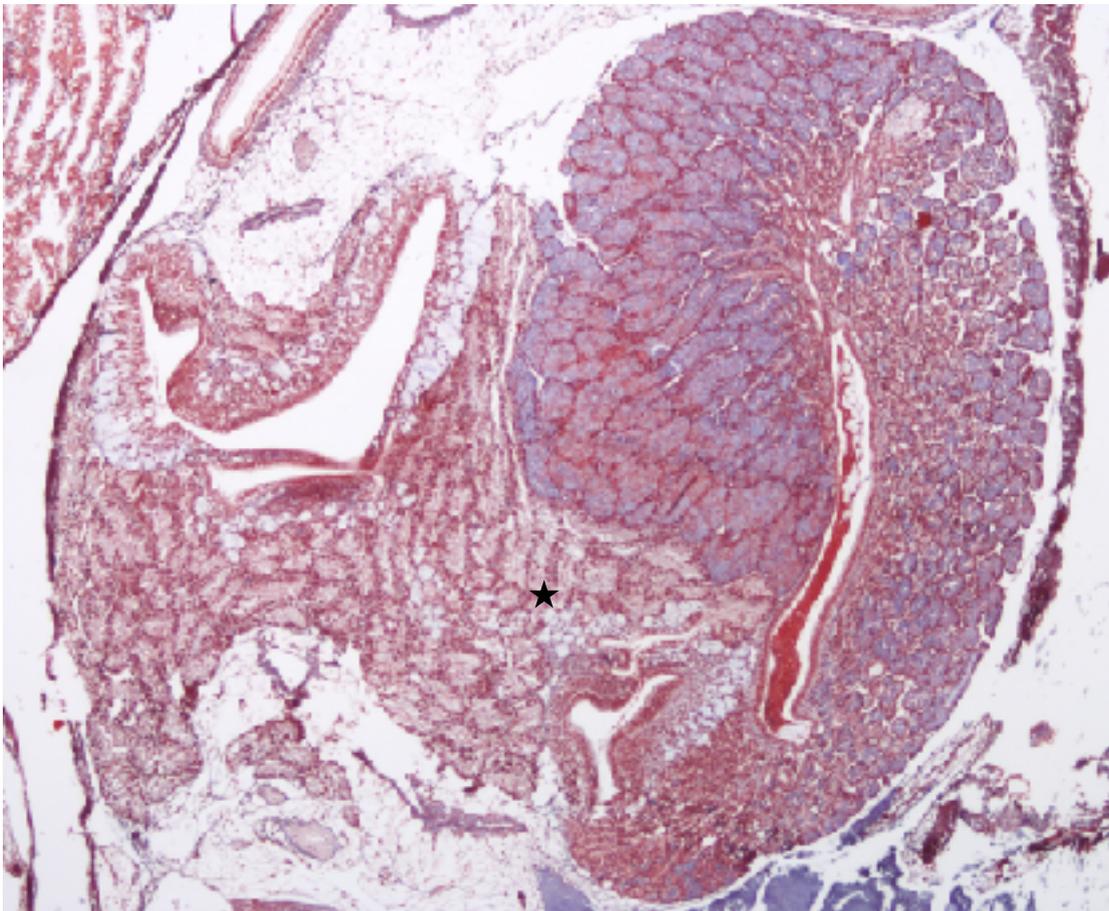


Fig. 18: La ghiandola dell'albume in *C. aspersum* appare compatta, ramificata, costituita da unità di secrezione tubulare, ghiandola prostatica, evidenziata dalla stella, 4X Tricomica di Masson.

del guscio oltre a fornire l'approvvigionamento alimentare dell'embrione (Duncan 1958).

L'epitelio della vescicola seminale è composto da cellule semplici e prismatiche con nucleo allungato circondato da citoplasma cromofilo.

La parte apicale è altamente vacuolizzata e ricca di vescicole secretorie.

Tutto è sostenuto da tessuto connettivo in cui alcune fibre sono disperse fibre muscolari lisce.

Le cellule muscolari sono molto più abbondanti nella parete sottostante, con una disposizione circolare. La giunzione esterna della parete contiene alcune fibre muscolari lisce longitudinali.

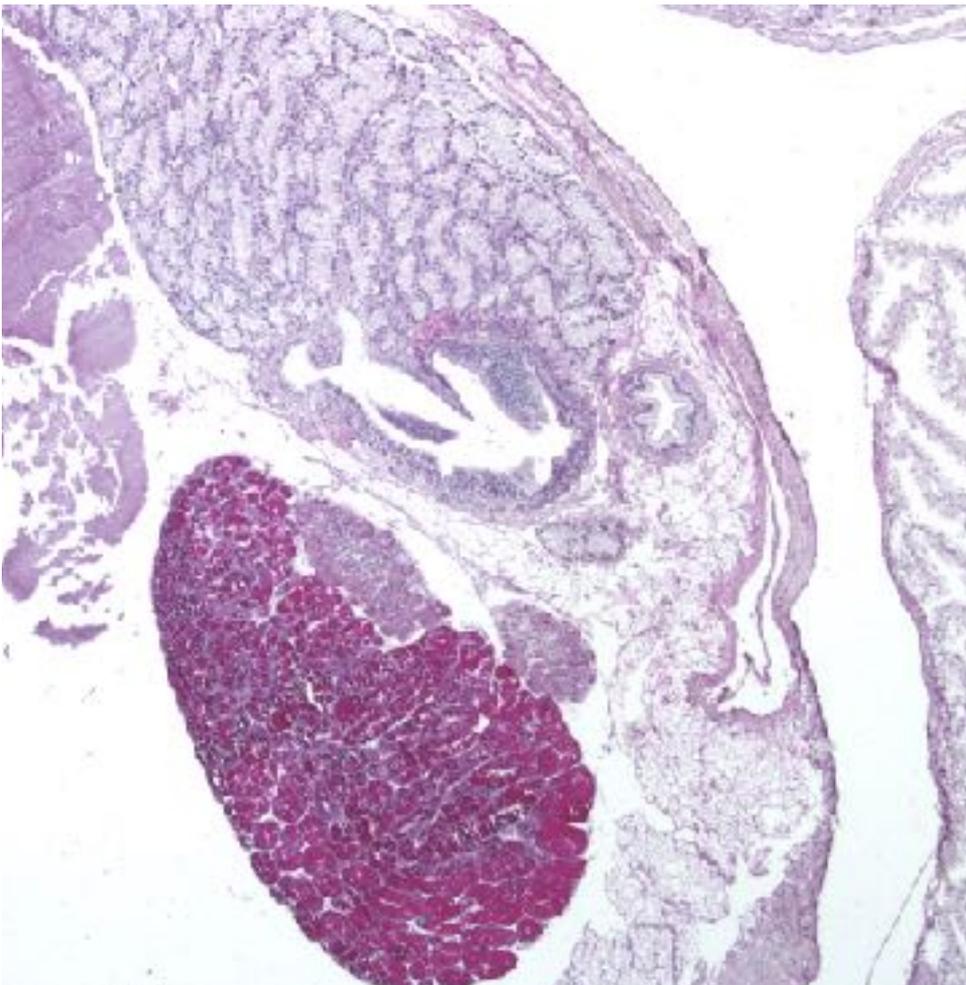


Fig. 19: Complesso delle ghiandole prostatiche accessorie, evidenti sono le cellule cubiche e cellule secretici che formano grandi globuli PAS-positivi. PAS, 4x.

# Capitolo II - Tecnologie di allevamento

## 2.1 Specie di interesse commerciale

I gasteropodi (classe Gastropoda, phylum Mollusca) sono costituiti da oltre 80.000 specie che abitano ambienti marini, d'acqua dolce e terrestre. Sono divisi in tre sottoclassi: Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata. Le chioccioline da allevamento appartengono tutte alla famiglia degli Elicidi. Le caratteristiche anatomiche e morfologiche sono state già descritte nella parte introduttiva, per cui ci si limita ora ad elencare le specie italiane eduli più importanti: *Cornu aspersum*, *Helix pomatia*, *Capea nemoralis*, *Helix lucorum*, *Theba pisana*.



Rif: [conchology.be](http://conchology.be).

**Dimensioni:**

Larghezza: max 35 mm

Altezza: 28–32 mm

Peso: fino a 15g

Brown Garden Snail: *Cornu aspersum* (O.F. Müller 1774).

In Francia è conosciuta come Petit gris o Chagrignè ed in Spagna è chiamata Caracolas.

**Descrizione:** conchiglia a parete relativamente sottile e sferica. Superficie increspata. Colore giallo/marrone con screziature gialle. Bordatura estremamente estesa e ripiegata all'indietro a formare un labbro distintamente bianco. Umbilicus columellare solitamente coperto dall'apertura del labbro. Estremamente variabile nell'aspetto.

**Habitat:** Cespugli, boschi aperti, steppe rocciose e colline di sabbia. Spesso anche in biotopi coltivati di tutti i tipi (inglese: "lumaca da giardino").

**Distribuzione:** Tutta la zona costiera del Mediterraneo e dell'Atlantico fino ai Paesi Bassi e alle Isole Britanniche. Sulle isole britanniche molto più comuni di *Helix pomatia*. In Germania è stata introdotta nella Valle del Reno superiore e nella zona del Basso Reno. A causa dei trasporti alimentari provenienti dal Mediterraneo la specie si è estesa quasi in tutto il mondo, anche negli Stati Uniti e in Australia.



Rif: [conchology.be](http://conchology.be).

**Dimensioni:**

Larghezza: 30–50 mm

Altezza: 30–45 mm

Peso: fino a 15g

Roman Snail: *Helix pomatia* Linnaeus 1758

In Francia è conosciuta come Grosblanc o Escargot de Bourgogne.

**Descrizione:** Conchiglia bulbosa sferica con 5 - 6 spirali arrotondate. Bordatura arrotondata e curvata all'indietro per formare un labbro. Umbilicus piccolo, coperto labbro columellare. Conchiglia color crema/bianco, banda longitudinale

scura talvolta poco visibile. Superficie delle bande con distinte strisce laterali di crescita.

**Distribuzione:** Europa Centrale e Sudorientale: dalla Francia Centrale e dall'Inghilterra meridionale in Occidente fino alla Bielorussia e all'Ucraina occidentale nell'Est, nell'Italia settentrionale del Sud, Macedonia nel sud-est.

**Habitat:** Popola gli habitat a siepi aperte, cespugli e i terreni ricchi di calcio. Evita le aree fortemente esposte al sole e le aree forestali scure. A volte presente nei giardini e nelle fattorie, anche raramente nei vigneti. Nelle Alpi si trovano fino a 2000 m sul livello del mare.

È stata allevata per molto tempo come specie principale in molti impianti di elicicoltura e il motivo è la raffinatezza delle sue carni. Oggi a causa dei lunghi tempi di maturazione sessuale è presente soltanto in una ristretta cerchia di impianti elicicoli.



Rif: [conchology.be](http://conchology.be).

**Dimensioni:** Larghezza: 38 mm,

Altezza: 35 mm.

Turkish Snail: *Helix lucorum* Linnaeus 1758

**Descrizione:** Conchiglia sferica con apice rotondeggiante. L'apertura è leggermente appiattita e lateralmente obliqua, il bordo dell'apertura ripiegato sopra il piccolo ombelico nell'area columellare. Superficie a grana fine e granulosa. Colore di base giallo brillante con ampie fasce scure su quasi tutte le spirali.

**Distribuzione:** Mediterraneo orientale: dall'Italia (Appennino occidentale) ai Balcani centrali, si estende anche in Romania meridionale e Bulgaria, in Tracia fino all'Asia Minore e la regione del Mar

Nero orientale.

**Habitat:** Cespugli, boschi aperti e aree agricole. Attivo solitamente solo nella notte e dopo la pioggia, scavato nel terreno durante i periodi di secco.

É un esemplare che presenta una conchiglia più arrotondata e possiede i tipici colori marrone scuro alternati a bande scure. Si adatta bene a tutti i terreni, argillosi e compatti compresi, per questo motivo viene allevata con una discreta frequenza in molte regioni italiane.



**Rif:** [conchology.be](http://conchology.be).

**Dimensioni:** 12–25 mm, Altezza: 9–20 mm.

*Theba pisana*: Descrizione: Il colore delle conchiglia varia da bianco a giallo-marrone con bande a spirale marrone chiaro. Distribuzione: Originaria della fascia Mediterranea *Theba pisana* (Mollusca: Helicidae) è considerata una specie invasiva in agricoltura in molti paesi nel mondo incluso Australia, Israele, USA and South Africa. In più questa specie è un ospite intermedio di parassiti di importanza sia per la salute umana che veterinaria (Sallam et al.; 2012).

**Habitat:** *Theba pisana* vive abitualmente sulle coste, per lo più negli ambienti retrodunali in prossimità dei litorali sabbiosi. Nei climi caldi si trova spesso direttamente esposta al sole, aggrappata alla vegetazione, arbusti o piante succulente o ai pali delle recinzioni. Nelle regioni più fredde non si estivano, ma non riuscendo a sopravvivere alle gelate invernali, si arrampicano sulle piante per trovare condizioni asciutte più favorevoli.

## 2.2 Attività elicicola: storia, tradizione e prospettive

L'origine del consumo di chioccioline in Europa risale al Paleolitico, epoca in cui le chioccioline venivano raccolte in natura o allevate in spazi chiusi, in maniera rudimentale, a partire dalla civiltà romana.

L'elicicoltura, intesa come attività imprenditoriale di tipo agricolo, nasce in Europa negli anni 70, per sopperire, attraverso una produzione gestita e controllata, alla diminuzione del prodotto prima reperito quasi esclusivamente in natura. Negli ultimi decenni le attività elicicole, hanno avuto ampio sviluppo, le conoscenze legate l'esperienze di gestione maturate in questi anni hanno permesso di selezionare quelle specie che meglio si prestano ad una attività di allevamento. Sono infatti quelle che meglio hanno dimostrato di adattarsi alle condizioni di vita in ambienti recintati e che presentano un adeguato ciclo riproduttivo in cattività. Secondo Avagnina, (2006), l'allevamento di chioccioline è un'attività agricola molto redditizia dato il fatto che la loro carne fornisce elevati livelli di proteine. La chiocciolina è sempre stata una fonte di proteine animali di qualità e ci sono numerosi piatti della tradizione che documentano il consumo di questi molluschi, sia come complemento sia come piatto principale.

Oggi giorno, l'elicicoltura può essere una fonte di produzione redditizia, economica e zootecnica.

Nel corso degli ultimi vent'anni allevatori e addetti al settore si sono cimentati per trovare il modo per rendere più efficiente e conveniente in termini di rapporto costo beneficio gli allevamenti al coperto.

Le chioccioline, sono state un alimento per gli esseri umani per migliaia di anni.

Oggi giorno vengono consumate da milioni di persone in tutto il mondo.

La produzione che deriva dall'allevamento a ciclo biologico, nato per sostituire la raccolta naturale, copre, per il momento, solo una minima parte dell'intera filiera dei consumi e le prospettive di espansione riferite a questo tipo di produzione e commercializzazione sono in continua crescita. L'Italia, con il suo sistema di allevamento all'aperto, caratterizzato da totale alimentazione vegetale e da condizioni pienamente naturali ed ecocompatibili, è tutt'ora nel mondo, al primo posto per il numero e per l'estensione degli allevamenti: circa 10.000 impianti per

9.000 ettari in attività e circa 300 milioni di euro di fatturato annuo per l'intera filiera. Il comparto generale della chiocciola, (gastronomia, ristorazione e di recente i prodotti di farmaceutica e per bellezza del corpo) nel 2016, ha registrato nel mondo un giro d'affari di 2,5 miliardi di dollari. (Fonte <http://www.istitutodielicoltura.it/>).

Il business mondiale delle chiocciole in questi ultimi anni, riferendoci alle piazze all'ingrosso, ha toccato e superato i 10 miliardi di Euro, e la quantità globale dei consumi è arrivata a toccare, all'inizio del nuovo secolo, la quota di 420.000 tonnellate (Fig. 1) (Avagnina, <http://www.istitutodielicoltura.it/>).

Molti altri paesi europei ed extraeuropei hanno raggiunto percentuali considerevoli di produzione.

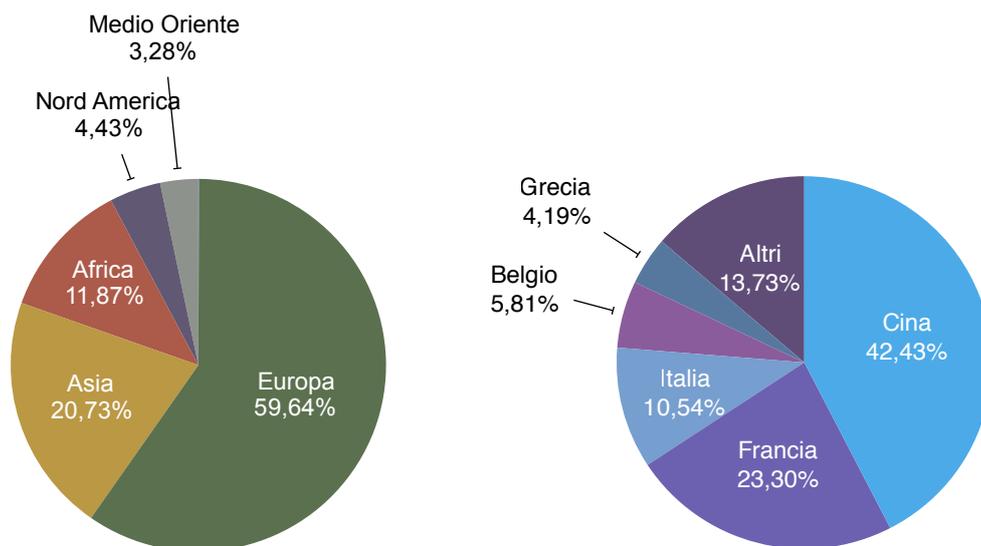


Fig 1: Import/Export mondiale di Gasteropodi polmonati terrestri; a sinistra, percentuale di prodotto esportato per paese di origine, a destra, percentuale di prodotto importato per paese di destinazione. Fonte: P.M. Parker, 2011.

La Grecia, i paesi dell'Est Europeo, la Romania, la Bulgaria, Nord Africa, soprattutto Tunisia e Marocco, hanno costruito in pochi anni migliaia di nuovi impianti mettendo a coltura oltre 6.000 ettari, sfruttando condizioni ideali per la disponibilità di terreno, con condizioni favorevoli per il costo del lavoro e aiuti finanziari della Comunità Europea dei governi statali. L'attuale tendenza italiana e in generale dei paesi esteri

è legata alla produzione di molluschi di taglia media, di facile e veloce cottura e di gusto delicato, come *Cornu aspersum*: il 95% degli allevamenti produce infatti questa specie, che risulta inoltre essere la più indicata all'allevamento a ciclo completo e ben si adatta alle diversità climatiche e orografiche dei luoghi destinati a tale scopo (<http://www.istitutodielicoltura.it/it/>).

## 2.3 Sperimentazione in allevamento

È in corso una continua sperimentazione su nuove e più innovative tecniche di allevamento a ciclo completo. L'elicicoltura per la produzione alimentare ha enormi potenzialità e nuove opportunità per lo sviluppo rurale e per i giovani imprenditori in Italia. Non sono ancora stati condotti studi sull'efficienza ambientale dell'allevamento di chioccioline che potrebbe anche essere uno strumento utile per i produttori. Nello studio effettuato da Forte et al. si è messo in evidenza l'impatto della carne di chiocciola in relazione all'impatto sulla produzione di CO<sub>2</sub> (CF) per un impianto di elicicoltura sperimentale semi-intensivo.

Lo studio ha riguardato le emissioni di gas a effetto serra (GHG) legate a fasi di produzione elicicola (allevamento, ingrasso, pulizia e imballaggio) di *Cornu aspersum* nella produzione di carni in un sistema di allevamento semi-intensivo in Italia meridionale.

Il CF ammontava a 0,7 kg di CO<sub>2</sub> eq per kg di carne fresca commestibile, con la quota più alta (circa il 60%) della produzione alimentare complementare. A causa dell'effetto combinato dell'entrata di quantità rilevante e della durata limitata della rete HDPE usata nell'impianto all'aperto, l'impatto dei recinti di allevamento è apparso considerevole (circa il 29%). Le emissioni di gas a effetto serra legate alla coltivazione del foraggio e alla fase di pulizia sembrano contenute (rispettivamente il 4% e il 5%), mentre la quota del sistema di riproduzione, dell'irrigazione e dell'imballaggio risulta trascurabile (1%). Il carico ambientale dell'alimentazione supplementare è risultato essenzialmente attribuibile (circa il 74%) alla coltivazione del grano e di mais (per la miscela di mangimi). È stato seguito dal trasporto del grano (circa il 17%) e dall'elaborazione (circa il 4%) per il mangime e l'ulteriore trasporto dei componenti di mangimi prodotti (grano di mais e carbonato di calcio) circa il 5%. Il punteggio CF potrebbe essere ridotto del 18%, incluso il potenziale

sequestro di CO<sub>2</sub> a lungo termine nelle conchiglie. Rispetto ad altre fonti di carne tradizionali di carni bovine, la carne di chiocciola ha mostrato ridotte emissioni di GHG (A. Forte et al.; 2016).

## 2.4 Tipologie di allevamento per *Cornu aspersum*

I tre sistemi di allevamento comunemente usati sono: chiuso o indoor, misto, aperto o outdoor (Vieites et al., 2006; Arditi et al., 2003).

L'attività produttiva all'aperto per fini commerciali deve essere esercitata su ampi spazi.

In riferimento all'estensione del terreno è possibile suddividere gli elicicoltori in tre distinte categorie: amatori, elicicoltori professionali e imprese elicicole.

Chi pratica questa attività sotto un profilo strettamente amatoriale non necessita di grandi spazi o manodopera per le varie fasi di allevamento. Per la gran parte degli elicicoltori professionali, tale attività viene vista come sussidiaria e non esclusiva ai fini del mantenimento aziendale, pur dedicando un numero considerevole di ore lavorative. Le aziende che rientrano in questa categoria, generalmente, possiedono degli allevamenti di media estensione. Per una superficie agricola utilizzata superiore ai due ettari, è possibile parlare di imprese elicicole. Imprese che possono sorgere ex-novo oppure come conversione o meglio ampliamento di allevamenti di piccole dimensioni. Nel corso degli ultimi anni questo tipo di aziende è aumentato in misura considerevole, facendo registrare attualmente, all'interno del comparto elicicolo, un numero di aziende aventi un'estensione agraria elevata che in alcuni casi raggiunge i trenta ettari. Tale tipologia di impianto è costituito da reparti specificatamente adibiti alla riproduzione ed altri dove avviene l'ingrasso e il finissaggio.

Indipendentemente dalle dimensioni aziendali, la scelta del luogo di ubicazione dell'impresa e del terreno ove effettuare l'allevamento all'aperto incide in modo considerevole sulla redditività dell'impresa. L'utilizzo di questo tipo di allevamento risulta incentivato anche dai costi relativamente limitati sia per la realizzazione dell'impianto sia per la sua gestione. Infatti, nonostante la chiocciola allevata allo stato brado sia soggetta ad un maggior rischio derivante dall'attacco di altri animali, quali insetti, volatili ecc. essa necessita di un minor impiego di mano d'opera



Fig. 2- Struttura di una corsia che compone un impianto elicicolo, si possono notare le recinzioni che delimitano le corsie e i passaggi perimetrali per consentire una più agevole manutenzione del parco. Fonte: <http://aurelio-vivereapierino.blogspot.it/2013/09/le-lumache-di-cherasco.html>

rispetto ad un allevamento al coperto, ove è richiesta la presenza di un numero maggiore di addetti in grado di espletare tutte quelle funzioni richieste dagli allevamenti al chiuso (apporto di alimenti, pulizia del suolo, asporto dei rifiuti, irrigazione artificiale ecc.

L'allevamento di tipo intensivo, risulta essere molto dispendioso in termini di ore di lavoro e di manodopera nonché di strutture necessarie , di contro è il sistema che offre un controllo più minuzioso dei parametri ambientali che potrebbero condizionare i tempi di maturazione degli esemplari allevati.

L'allevamento di tale specie può essere realizzato provvedendo a nutrire i molluschi con vegetali oppure con particolari alimenti bilanciati all'interno di capannoni, serre o tunnel che isolano l'allevamento dai rischi ambientali.

L'allevamento all'aperto consiste, nell'ingrasso delle chioccioline in un sistema estensivo in modo ecologico, vale a dire rispettando il ciclo biologico degli esemplari, attenendosi alle norme ecologiche di produzione agricola (Fig. 2). Esso si attua attraverso l'immissione delle chioccioline in appositi recinti, le quali accoppiandosi e generando nuove chioccioline forniranno il prodotto da immettere sul mercato.

## 2.5 Fattori chiave per la riuscita di un impianto elicicolo

Le informazioni presentate in questa relazione sono state raccolte per un periodo di circa tre anni e vengono proposte come informazioni di carattere tecnico/pratico.

I fattori ambientali hanno un peso notevole nell'allevamento di specie animali, qualunque esse siano. tra i Polmonati, molti fattori sia abiotici (clima, nutrizione) che biotici (età, densità, genetica) influenzano la crescita, sia in termini di velocità che in termini di dimensione.

In elicicoltura i fattori chiave sono certamente l'umidità, la natura del suolo, la temperatura e la densità degli individui per m<sup>2</sup>. Allo stesso modo, il fotoperiodo nonché la disponibilità di carbonato di calcio nel suolo hanno un ruolo importante nell'aumento del volume della conchiglia delle chioccioline degli individui ha un'influenza preponderante sulla crescita.

Nei molluschi gasteropodi terrestri appartenenti ai Pulmonata, la crescita può essere di due forme, un tipo continuo che è stata osservata principalmente tra chioccioline del genere *Arionidae*, oppure discontinuo, vale a dire, con crescita che rallenta o si ferma del tutto quando le condizioni diventano sfavorevoli, tale tipo di accrescimento è stato registrato nelle varie specie di chioccioline appartenenti alle specie *Cepaea nemoralis*, *Theba pisana* (Muller), *Helix pomatia* nonché *Cornu aspersum* (J. Daguzan et al.; 1982).

I fattori da prendere in considerazione per scegliere il luogo più adatto per l'allevamento delle chioccioline secondo il sistema proposto sono i seguenti:

### 2.5.1 Temperatura

La temperatura e l'umidità hanno un ruolo molto importante nell'allevamento e nello sviluppo della chiocciolina.

La temperatura ideale per la crescita oscilla tra il 15° e i 20°C. In questo intervallo le chioccioline si riproducono, si alimentano e sono attive. Sotto i 15 ° diminuiscono la loro attività, e dal 10 iniziano a ibernarsi (Biannic M., Daguzan M.; 1993). Le temperature inferiori a 0 ° possono persino causare la morte per congelamento.

D'altra parte, se la temperatura supera i 30° le chioccioline si estivano, se l'umidità non è elevata.

Nei mesi freddi le chioccioline vanno in ibernazione e vi rimangono dai 4 ai 6 mesi.

Nei periodi di estivazione e di ibernazione gli individui si rintanano nella conchiglia chiudendola attraverso l'epifragma, riducono la loro attività vitale e metabolica, decresce il ritmo respiratorio e il consumo di ossigeno, si arresta la crescita (Iglesias J. et al., 1999)

Con la ripresa delle attività metaboliche si assiste ad un incremento notevole in peso e volume dovuto all'assorbimento dell'acqua.

BIANNIC & DAGUZAN's (1993) suggeriscono che, in *C. aspersum*, vi è una correlazione stretta tra la riduzione del fotoperiodo e lo sviluppo della resistenza al freddo. Nel loro studio, l'esemplare adulto di *C. aspersum*, che si è acclimatato a un fotoperiodo di breve durata (12L:12D), aveva una maggiore capacità di sovraraffreddamento rispetto agli individui che si erano adattati a un fotoperiodo diurno (16L:8D) a 20°C. Ciò ha suggerito, tuttavia, che le risposte antigelo preparatorie non erano associate all'accumulo di crioprotettori.

L'umidità è un parametro cruciale, esso è regolabile modulando i tempi e la frequenza di irrigazione, il metodo più comunemente usato è quello a pioggia, di contro tale metodo risulta poco conforme alle esigenze di questi animali che in ambiente naturale preferiscono un tenore di umidità elevato senza gli eccessi che

la dispersione a pioggia potrebbe causare. Tale fattore potrebbe contribuire ad un aumento della mortalità della popolazione di chioccioline.

Per tali ragioni si ritiene che la nebulizzazione attraverso opportuni ugelli, posti ad intervalli regolari, possa creare le condizioni ottimali affinché si raggiunga la giusta umidità ambientale, sia aerea che a livello del suolo, evitando pozze di ristagno.

## 2.5.2 Densità

In linea generale, sembra che minore è la densità, maggiore è l'assunzione di cibo da parte delle chioccioline, di conseguenza maggiore risulta essere la percentuale di animali adulti.

Solo lo studio di Charrier e Daguzan dà una densità ottimale: le prestazioni di crescita migliorate fino a una densità di 133 individui per m<sup>2</sup> (effetto gruppo) e poi diminuito di questo valore (effetto di massa).

Gli studi di Cameron e Carter e di Dan e Bailey dimostrano che quando si aumenta la densità, l'attività e quindi la crescita degli animali sono inibiti. Essi suggeriscono che esistono nel muco dei feromoni inibitori.

In *Cepaea nemoralis*, l'aumento della densità degli individui promuove, in primo luogo, locomozione e assunzione di cibo, questo provoca una eccessiva secrezione di muco che a sua volta inibisce sia la locomozione che il consumo di alimenti e quindi indirettamente la crescita degli individui (Oosterhoff, 1977).

## 2.5.3 Natura del suolo

Per quanto concerne la natura del suolo, sono i terreni calcarei quelli che maggiormente rispondono alle necessità biologiche delle chioccioline, in quanto essendo ricchi di carbonati vengono introdotti per via orale per poi rielaborati e utilizzati nella formazione della conchiglia. Tale tipologia di terreno ha un buon grado di ritenzione dell'acqua, oltre a trattenere il calore e l'umidità fattori che giocano un ruolo cruciale nella creazione dell'habitat più favorevole a tali specie di molluschi gasteropodi, incentivando altresì la resa in termini di velocità di accrescimento, vitalità e tasso di riproduzione.

Considerando che la chiocciola, in questa tipologia di allevamento, vivrà tutta la sua esistenza all'aperto e quindi seguendo quello che dovrebbe essere il suo naturale ciclo biologico di vita è indispensabile, come detto in precedenza, tener conto, all'atto della scelta della localizzazione aziendale, di un insieme di fattori (struttura chimica del terreno, disponibilità d'acqua ecc.). Al fine di rendere quanto più produttiva possibile l'attività, il terreno preposto all'allevamento dovrebbe possedere alcune caratteristiche, chiamate in gergo condizioni positive individuabili in: tessitura argillosa, o mista; giusto equilibrio granulometrico tra sabbia, limo, argilla; presenza di carbonato di calcio assimilabile; assenza di alberature o alberatura regolare con ampi spazi tra le file di piante; disponibilità di acqua per consentire l'irrigazione durante i mesi estivi; ubicazione in aree pianeggianti (per agevolare le operazioni di manutenzione); favorevole esposizione al sole.

#### 2.5.4 Elementi Essenziali

Il carbonato di calcio rappresenta un elemento fondamentale della conchiglia, dell'opercolo, della radula, del dardo e del guscio delle uova.

La chiocciola ha bisogno del suolo di essere ricco di carbonato di calcio per la sua crescita e il corretto sviluppo del guscio. Pertanto, il suolo deve possedere adeguate caratteristiche biochimiche, deve essere di tipo calcareo.

Il carbonato di calcio per uso zootecnico è una fonte di calcio concentrato e viene utilizzato per produrre miscele di foraggi o per alimentazione diretta in miscele minerali. E' la tipologia di calcio utilizzato da anni nell'alimentazione degli animali come supplemento di minerali necessari, indispensabili per una buona salute degli stock di allevamento.

La chiocciola assorbe il calcio in tre modi differenti: nutrendosi delle erbe del proprio pascolo; attraverso la pelle (contatto con l'acqua); grattando con il proprio apparato radulare il terreno e le rocce calcaree.

Il campo deve essere prevalentemente ombreggiata per dare un ambiente umido e protetto dal vento che può influenzare l'umidità.

È quindi necessario che l'impianto abbia una vegetazione densa, in particolare arbusti e alberi per fornire ombra e schermi al vento, oltre a evitare l'evaporazione dell'acqua dal suolo e creare un microclima umido.

Le chiocciole hanno bisogno di scavare nel terreno per deporre le uova, per tale motivo non sono adatte terre rocciose, paludose o densamente argillose.

Per evitare la formazione di acqua, il terreno deve essere leggermente inclinato e drenato.

Qualora, per esempio, il terreno scelto per l'allevamento dovesse risultare poco fertile, una eventuale concimazione consentirebbe di sopperire a questo requisito od ancora, l'assenza di carbonato di calcio nel suolo potrebbe essere corretta inserendo all'interno dei recinti dei mucchietti di polvere di marmo e carbonato di calcio di tipo zootecnico.

Negli allevamenti all'aperto, assume particolare importanza il metodo di irrigazione utilizzato.

Data la natura degli animali allevati ed in particolare la loro dimensione, l'irrigazione deve risultare adeguata. Il miglior sistema di irrigazione è quello composto da nebulizzatori, in un sistema di nebulizzazione con ugelli ogni 2 metri.

## 2.5.5 Alimentazione

La composizione dei pascoli per l'alimentazione delle chiocciole può variare notevolmente a seconda delle aree geografiche, del clima, delle condizioni del terreno, ma in genere si opta per la semina di un mix che contiene almeno semi di trifoglio dolce, bietola e girasole. La dieta delle chiocciole varia a seconda delle stagioni ed è più diversificata nei mesi autunnali (Cesari, 1980). Predilige *Urtica dioica* perché ha un alto contenuto di proteine e calcio, Iglesias e Castillejo hanno suggerito che l'alto contenuto di calcio di *U. Dioica* potrebbe essere un fattore determinante primario nella scelta di tale alimento.

Tuttavia, a questi possono associarsi anche germogli di soia, broccoli, cavoli, carote, cavolfiore, zucchini, cetriolo, fagiolini, porri, lattuga, funghi, piselli, patate, zucca, spinaci, mais, rapa, crescione, tarassaco. Il tutto va integrato con specie aromatiche.

La piantagione è composta da una miscela di piante che creano una prateria permanente dove le chiocciole trovano cibo e riparo.

Delle specie vegetali piantate è possibile sottolineare: *Trifolium repens*, *Hierucium pilosella* e *Prunella vulgaris* e *Bromus erectus*.

Il trifoglio serve come alimento per la crescita durante il primo mese di vita, oltre a mantenere un'umidità relativa più adeguata all'attività delle chioccioline anche nelle prime fasi della giornata. Inoltre il trifoglio è principalmente un buon nascondiglio per gli esemplari appena introdotti, i quali potranno ripararsi dal caldo eccessivo delle ore diurne, lasciando solo durante la notte o nel momento in cui la pressione atmosferica diminuisce. (S. Lederberger et al. 1998)

I giovanili saranno alimentati in linea di massima con piante fresche coltivate nel campo e saranno integrate in seguito (dalla settimana di rilascio), con mangimi composti principalmente di cereali coltivati biologicamente sulla stessa corsia o dai mangimi trasformati al 100% con materiali da agricoltura biologica.

## 2.6. Pianificazione del campo

Una volta che il terreno è stato scelto, le strutture devono essere progettate in modo che il suolo sia utilizzato in modo efficiente e che le strutture consentano una comoda gestione.

In linea generale la dimensione e la distribuzione delle corsie può essere determinata dall'orografia del terreno.

Ogni corsia avrà una copertura vegetale densa. Le strutture devono inoltre avere la superficie necessaria per la produzione di alimenti vegetali.

Le linee devono essere progettate per isolare bene le corsie (Fig 2).

Le corsie devono essere identificate in lotti, indicando per ciascun lotto la data di immissione delle chioccioline nel parco e la data di raccolta.

All'inizio dell'attività, cioè il primo anno di realizzazione e prima di montare le corsie, il terreno viene preparato per la piantumazione. Poiché ciò che si vuole ottenere è un prato perenne, il lavoro sarà fatto una sola volta. A fine dell'estate, quando il terreno acquista uno stato in cui la quantità di umidità permette di eseguire lavori senza alterarne la struttura, è consigliabile a smuovere la terra nei primi 50 cm di sottosuolo per decomprimere il terreno.

Per una conduzione della produzione economicamente proficua e sostenibile risulta importante la creazione di una recinzione efficace. Recintare il campo vuol dire

evitare la fuga dei molluschi ed allo stesso tempo proteggere gli stessi dagli attacchi di possibili predatori.

La recinzione più comune è costituita dalla lamiera zincata avente uno spessore di circa 3/10mm. Viene interrata per circa 40 centimetri di profondità, posizionata perpendicolare al terreno con un'altezza di almeno 50/60 cm al di sopra del suolo e. Così predisposta, questa recinzione impedisce da un lato l'ingresso all'interno dell'allevamento di talpe od altri possibili predatori e dall'altro che le chioccioline possano uscire dal recinto disperdendosi nei terreni confinanti. Le lamiere zincate nella maggior parte degli allevamenti vengono utilizzate per delimitare gli spazi degli allevamenti dal terreno circostante, mentre per le recinzioni interne allo stesso allevamento normalmente si fa uso di una rete. Questi recinti, vere e proprie strisce di terreno, hanno una lunghezza non superiore ai 50 metri, mentre la larghezza varia tra i due metri e mezzo ed i quattro. Essi sono separati gli uni dagli altri da sentieri privi di vegetazione, passaggi, larghi all'incirca un metro, che permettono all'allevatore di poter effettuare le operazioni di coltura e manutenzione senza compromettere il raccolto. Le strisce di terreno delimitate da apposite reti, vengono destinate alla coltivazione di vegetali, svolgeranno il duplice ruolo di fornire il giusto nutrimento e, nel contempo, di proteggere dall'eccessiva insolazione e dalle escursioni termiche durante il l'intero ciclo.

Le corsie sono contrassegnate dove la piantagione sarà posta, per evitare sovrapposizioni.

Sarà inoltre utile accedere alle strutture con veicoli di larghezza non superiore ai 4 metri.

Infine, l'impianto dovrebbe avere un piccolo edificio (da 10 a 15 m<sup>2</sup>), per accogliere gli utensili necessari, nonché un'area secca dove conservare l'alimentazione e un'area con ripiani dove mettere le chioccioline ad asciugare e spurgare.

## 2.6.1 Raccolta

La raccolta delle chioccioline deve essere effettuata al giusto periodo di maturazione e di crescita del prodotto. Al fine di identificare tale livello di maturazione la parte terminale della conchiglia deve presentare una bordatura. A questo punto gli esemplari sono pronti per essere manipolati e successivamente destinati al

mercato, la bordatura non solo è indice di completa maturazione dell'individuo, è inoltre, sotto un profilo puramente pratico, permette all'operatore di poter maneggiarli senza creare danni o rotture.

La raccolta può essere portata avanti in maniera continua in modo tale da assicurare costantemente il prodotto sul mercato durante l'intero anno.

In più raccogliendo le chiocciola con una certa periodicità si riduce progressivamente la densità al metro quadrato agevolando e massimizzando il processo di crescita dei molluschi che non sono ancora al giusto grado di maturazione.

La raccolta selvatica offre poca garanzia di qualità e sicurezza, oltre che le chioccioline presentano dimensioni variabili.

## 2.6.2 Attività amministrative

I compiti amministrativi corrispondono alla preparazione di fatture e fatture, pagamento di fornitori e raccolta di clienti, preparazione di rotte di consegna degli ordini, nonché qualsiasi altra attività relativa all'amministrazione.

Essi comprendono anche compiti che soddisfano i requisiti legali applicabili, quali:

- Aggiornamento del libro degli allevamenti e del marchio ufficiale.
- Registrazione nel registro delle aziende agricole di allevamento a vocazione elicicola.
- Aggiornare la documentazione e svolgere le procedure per ottenere e mantenere la certificazione di produzione biologica (facoltativo, ma consigliabile).
- Procedure per ottenere e rinnovare la licenza ambientale.
- Procedure per l'ottenimento di sovvenzioni e aiuti governativi o comunitari.

## 2.6.3 Legislazione

Regolamento che proibisce e disciplina la vendita di chioccioline selvatiche dalla raccolta.

Nel 2007, a seguito della legge regionale n.9 del 23 aprile, "Norme in materia di risorse forestali" nella sezione "Tutela della flora e della fauna di importanza comunitaria e di interesse regionale" articolo 65, è stata vietata la raccolta di tutte le chioccioline appartenenti al genere *Helix*, l'attuale *Cornu aspersum*. In seguito

l'articolo 65 è stato modificato dalla legge regionale n.16 del 5 dicembre 2008, (pubblicata nel 1°supplemento ordinario n.27 del 12/12/2008 al Bollettino Ufficiale n. 50 del 10/12/2008) in cui si concede la raccolta fino a 2kg per persona e si predispone una sanzione amministrativa pecunaria da 10 € a 50 € per ogni chilogrammo o frazione di chilogrammo in più a quanto è consentita la raccolta.

Ad oggi non è stata emanata una legislazione nazionale che regolamenti l'elicoltura che, come ogni altra attività agricola, richiede una particolare attenzione alla cura e alla bontà degli ortaggi, agli attacchi degli insetti, alla selezione e alla spurgatura, due delle fasi più importanti che consentono di offrire prodotti di qualità.

### 2.7.1 Manutenzione sanitaria degli impianti

Il gestore della manutenzione con l'aiuto del coordinatore, pianifica i compiti preventivi da svolgere e quanto spesso assicura la manutenzione degli impianti e la corretta crescita delle chioccioline.

L'insieme dei compiti è incluso nel piano sanitario per la prevenzione delle malattie.

### 2.7.2 Piano sanitario

In generale, il piano sanitario si basa sulla prevenzione dell'insorgenza delle malattie, nonché sul controllo e la profilassi e sull'eradicazione delle malattie che appaiono.

La salute in azienda è ottenuta con una buona dieta (equilibrata, ecologica e appropriata ad ogni stadio dell'animale) e lavorando con specie autoctone come sopra indicato.

È anche importante ricordare che la prevenzione delle malattie è ottenuta soprattutto prevenendo lo stress e garantendo il benessere degli animali. In questo senso è imperativo rispettare i cicli e i comportamenti animali naturali.

Pulizia dei vassoi di alimentazione: prima di mettere l'alimentazione dei mangimi, i resti del giorno precedente devono essere rimossi per evitare colonizzazioni batteriche. La pulizia giornalieri con perossidi è consigliabile per prevenire la diffusione delle infezioni.

Pulizia dei parchi: è essenziale mantenere l'impianto il più possibile pulito, rimozione settimanale di tutti i residui di chiocciole, vertebrati e invertebrati indesiderati, o piante che non contribuiscono all'alimentazione.

Le chiocciole morte o quelle che sembrano malate devono essere rimosse almeno settimanalmente.

Per mantenere la vegetazione del parco, in particolare il trifoglio bianco, occorre prestare attenzione a rimuovere i residui che possono bruciare le foglie.

Rassegna del perimetro di recinzione: ogni giorno viene effettuato un giro in tutto il perimetro del parco per verificare che non esistano zone deteriorate attraverso le quali le chiocciole potrebbero scappare e / o far entrare dei predatori. In caso di individuazione di eventuali danni saranno riparati al momento.

Controllo dell'impianto di irrigazione: ogni giorno, dopo l'azionamento dei nebulizzatori, si dovrà verificare che non ci sono perdite d'acqua che possono portare ad una inondazione e portare conseguenze dannose per gli animali e per l'impianto. Sarà inoltre verificato che tutti i nebulizzatori funzionino correttamente. Nel caso di un incidente, sarà fissato al momento.

Altre misure da prendere in considerazione per la prevenzione delle malattie sono le seguenti:

- sistemazione di vaschette sanitarie all'entrata dell'impianto per evitare contaminazioni
- il posizionamento delle trappole per insetti e roditori
- eseguire un controllo di roditori che possano contaminare il mangime
- controllo dell'ingresso delle persone, su appuntamento, e consegna di abiti e vestiario per l'accesso ai parchi.

Parlapani 2013 in un suo lavoro descrive la crescente minaccia di patogeni alimentari come *Salmonella spp.*, *Escherichia coli O157* e *Listeria monocytogenes* ha aumentato la preoccupazione dei consumatori per quanto riguarda la sicurezza alimentare. *Salmonella spp.* risulta essere tra i principali responsabili di malattie gastrointestinali in tutto il mondo. In passato, chiocciole commestibili vive erano coinvolte con problemi di *Salmonella spp.* contaminazione.

Sebbene le chiocciole siano consumate da milioni di persone nel mondo, sono stati condotti pochissimi studi relativi alla microbiologia e all'igiene della carne di

chiocciola di terra e nessuno ha pubblicato nelle riviste scientifiche, alle nostre conoscenze, per quanto riguarda le chioccioline delle aziende agricole. L'applicazione di sistemi Good Hygiene Practice (GHP) e di Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) richiede la conoscenza dei potenziali pericoli e dei loro livelli. Tenuto conto del crescente interesse per l'allevamento di chioccioline sembra essenziale uno studio sull'igiene delle chioccioline vive e l'efficacia della trasformazione nel ridurre il carico microbico nella carne di chiocciola.

## 2.8. Patologie in allevamento

I patogeni, compresi virus, batteri, funghi, protozoi e nematodi, sono comunemente isolati da insetti e da altri ospiti invertebrati. Il loro naturale avvenimento nelle popolazioni invertebrate contribuisce alla regolazione dei parassiti potenzialmente dannosi per esseri umani e delle loro colture, delle famiglie e degli animali domestici. Questi entomopatogeni hanno potenziale per programmi di controllo microbiologico (Steinhaus, 1956) e molti di loro sono stati sfruttati per il controllo degli insetti attraverso rilasci inundativi, diffusivi e inoculativi (Lacey et al., 2001).

Tra le malattie più frequenti in elicottura, vi sono quelle prodotte da predatori e parassiti e da quelli prodotti da microrganismi.

Come in qualsiasi altro sistema di allevamento, le patologie ambientali potrebbero essere correlate a squilibri quali condizioni ambientali, elevate densità di popolazione, alimentazione sbilanciata e mancanza di cura degli impianti. In uno studio di Parlapani si evidenzia come nelle chioccioline allevate l'assenza di *Salmonella* spp. dimostra che in condizioni controllate la probabilità di trovare agenti patogeni è bassa e tutto ciò contribuisce alla sicurezza alimentare e alla salute pubblica. L'allevamento delle chioccioline in condizioni controllate e l'attuazione di buone pratiche agricole e sistemi di gestione potrebbero essere indispensabili per la produzione di un prodotto sicuro (Parlapani 2014).

Come indicato nel piano sanitario, è importante una buona profilassi e mantenere una buona pulizia nelle corsie, al fine di evitare elevate densità, e morie incontrollate.

Di fronte all'apparire di ogni parassita, è importante essere sicuri della causa, in quanto la soluzione a ciascun problema richiede un approccio differente. Sarà buona norma osservare attentamente gli animali malati, per essere in grado di rilevare la presenza di parassiti ed eventualmente scartarli, nel caso in cui la patogenesi sia di tipo infettivo.

Di seguito vengono descritte le patologie principali che appaiono nei sistemi di allevamento controllati, nonché il trattamento e la possibile prevenzione.

## 2.8.1 Nematodi

Ci sono diverse specie di nematodi che parassitano gasteropodi terrestri, i più noti e soliti sono i seguenti:

*Alloionema appendiculata*: facoltativo e non letale, trovato nel rene (nefridio) e nel mantello (Segade P, et al. 2013).

*Angiostoma aspersae*: Studi hanno dimostrato che questo nematode non provoca la morte nelle popolazioni di gasteropodi terrestri. Sono parassiti obbligatori dell'intestino delle lumache. Gli adulti una volta insediatisi, producono uova che vengono versate nelle feci e successivamente ingerite da altre lumache, in seguito le uova si sviluppano in adulti.

*Nemhelix bakeri* (Segade P, et al. 2013) trovato nel tratto genitale di *C. aspersum*.

*Phasmarhabditis ermafrodita*: *C. aspersum* risulta più suscettibile all'ingresso di *P. hermaphrodita* quando il suo peso corporeo è di circa 1 g (P.E. Kramarz et al.; 2007) Il sito di ingresso è probabilmente attraverso il pneumostoma o attraverso altre aperture naturali (P.E. Kramarz et al.; 2007).

Il ciclo evolutivo della malattia è stato osservato da Wilson et al. 1993 in *Deroceras reticulatum*. Una volta dentro, i giovani si sviluppano in adulti e si riproducono. Durante questo periodo, l'esemplare infetto sviluppa un caratteristico gonfiore nella regione del mantello. Entro 7-21 giorni dall'infezione, la chiocciola muore, i nematodi si diffondono dal mantello e si nutrono del cadavere. Una volta esaurito il cibo i nematodi non si sviluppano in adulti, ma sviluppano nuovamente esemplari giovani che partono in cerca di nuovi ospiti.

Quando comincia la malattia non ci sono sintomi apparenti, quando è già avanzata la chiocciola è ferma, letargica.

Per garantire che la causa della malattia sia causata da nematodi, l'esemplare interessato viene posto su una piastra, tipo Petri, un un leggero fondo d'acqua. In seguito, i nematodi , eventualmente presenti, possono essere osservati al microscopio ottico o con una lente di ingrandimento tali organismi si presentano senza un movimento coordinato ma dall'andamento sinusoidale.

Possibile causa è l'ingestione di alimenti in cattive condizioni o la mancanza di igiene, in quanto l'infestazione si diffonde attraverso gli escrementi nei quali si moltiplica facilmente.

Al fine di evitare la diffusione si consiglia di rimuovere giornalmente gli esemplari che presentano segni di possibile infezione, in modo tale che gli individui potenzialmente infetti non restino a contatto con le altri.

## 2.8.2 Flagellati

*Tetratrichomonas limacis* riscontrato principalmente nel tratto digerente, mentre *Cryptobia helicogena* è stato individuato nella bursa copulatrix. (Segade P., et al. 2013)

## 2.8.3 Trematodi

Diverse specie della famiglia dei Brachylaimidae, sono state trovate in *Cornu aspersum* (Segade P, et al. 2013). I trematodi hanno cicli di vita complessi, sono parassiti sia di vertebrati che di invertebrati. Essi inoltre presentano un'alternanza di generazioni complessa, noto come eterogonia in cui si susseguono più generazioni per partenogenesi consecutive.

Le uova passano dall'ospite alle feci. Quando le uova raggiungono l'ambiente esterno, nascono le larve, miracidii. Il miracidio penetra nell'ospite intermedio, in questo caso la chiocciola, all'interno del quale diventano sporozoi.

Le cellule di cisti spore si dividono per formare redie che, partenogenesi, originano le cercariae, le forme libere di nuoto che lasciano l'ospite intermedio e attraverso degli enzimi specifici, perforano la copertura del secondo ospite intermedio, di solito un artropode, per poi entrare e raggiungere lo stadio adulto.

Le fasi larvali di sporociti, redie e cercariae dei trematodi che parassitano le chioccioline, si trovano di solito nell'ovotestis e nella ghiandola dell'albume, alterando

seriamente la funzione riproduttiva, dovuta al blocco indiretto di secrezioni ormonali dovuta alla moltiplicazione di sporociti, producendo la cosiddetta "castrazione da parassiti".

## 2.8.4 Acari

Gli acari sono maggiormente rappresentati da *Riccardoella limacum* (Segade P., et al. 2013) Mite non più grande di 0,4 mm, ricoperto da tegumento di colorazione biancastra finemente granulato e presenta 3 o 4 coppie di appendici ambulacrali.: si trovano per lo più al riparo nel bordo conchigliare o nel pneumostoma, attraverso il quale entrano per raggiungere il polmone e nutrirsi del sangue del loro ospite. E' stato dimostrato come questi parassiti siano in grado di provocare sia una diminuzione della crescita fino al 40%, sia problemi riproduttivi (Segade P, et al. 2013).

La massiccia presenza di acari è uno dei maggiori pericoli in allevamento, poiché un'alta concentrazione di parassiti nella cavità del mantello produce processi anemici pesanti, con ripercussioni nella riproduzione e crescita può talvolta uccidere le chioccioline parassitate.

Sintomi: le femmine depositano le uova (bianco perlaceo e 180 µ di lunghezza) tra le fibre muscolari e nelle pieghe della cavità palleale.

Le larve penetrano attraverso il pneumostoma nella cavità del mantello, dove succhiano l'emolinfa dell'ospite, lasciandolo indebolito e più suscettibile ad altre malattie. Causa di occorrenza: di solito appaiono durante l'estate, in quanto necessitano di condizioni climatiche favorevoli. Essi appaiono per mancanza di umidità e vengono trasmessi attraverso i vestiti dell'operatore o dagli utensili utilizzati.

Trattamento: l'acariosi viene trasmessa in maniera orizzontale anche se non avviene contatto diretto. Possibile via di diffusione potrebbe essere anche il cibo o i vestiti dell'operatore. Per prevenire la diffusione della malattia è utile separare i soggetti affetti, ponendoli in una zona di quarantena.

## 2.8.6 Ditteri

I soggetti allo stato selvatico sono spesso invece colpiti da ditteri, i quali rilasciano le loro uova sulla conchiglia del mollusco e all'interno di esso completando il loro ciclo di sviluppo, sembrano in particolare preferire gli esemplari che hanno appena deposto (Elmslie, 2005).

Sintomi: presenza di mosche. Morte di animali deboli.

Causa di occorrenza: mancanza di pulizia e cattiva gestione delle corsie. Le larve si sviluppano nei residui umidi e decomposti.

Trattamento: pulizia, rimuovendo frequentemente le chiocciolate morte. Installazione di trappole adesive, disinfezioni durante l'evacuazione sanitaria.

## 2.8.7 Funghi

Nelle chiocciolate allevate è possibile constatare frequentemente la presenza di nematodi e di acari, entrambi fonti di gravi danni, oltre alla presenza di funghi come *Aspergillus*: si sviluppa in individui adulti. L'*Aspergillus* (Lawrence A. et al. 2007) infetta i gasteropodi polmonati terrestri.

Sintomi:

*Aspergillus*: Alcuni ceppi di genere *Aspergillus flavus* (Lawrence A. et al. 2007), a contaminare mal conservato o mangime umido, produrre un numero di tossine, "aflatossine" che producono nelle lumache necrosi epatica e morte rapida.

Cause di occorrenza: In generale, hanno bisogno di loro per la loro normale sviluppo umidità elevata e temperature medie.

Trattamento: per controllare i funghi ha regolare l'umidità nell'operazione (atmosfera controllata), questo impedisce la crescita fungina richiede anche strumenti di pulizia rigorose per impedire la fermentazione di introduzione di rifiuti e le feci, evitano l'accumulo di acqua poiché questi predispongono all'insorgenza della micosi.

Per monitorare l'aspergillosi, è necessario controllare il contenuto alimentare, soprattutto verificarne il tasso di umidità. A tal fine, è necessario tenerlo al riparo dai parchi, in luogo asciutto e ventilato stivarlo in contenitori preferibilmente non a contatto diretto con il terreno.

## 2.8.8 Altre cause di mortalità

Oltre alle cause precedentemente descritte ci sono altri fattori che possono causare malattia o addirittura la morte degli individui:

Morte causata da puntura d'insetto: la chiocciola morta presenta il corpo ritrattato nella conchiglia, il corpo appare coartato e il piede posteriore protratto sul bordo esterno. Nella fase post-mortem, entra velocemente in uno stato di putrefazione con un evidente infiltrato di natura infettiva.

Morte per disidratazione: la chiocciola ha il suo corpo ritratto nella conchiglia attaccata e senza mucillagini.

Esposizione eccessiva ai raggi UV: il corpo appare del colore e della consistenza del carbone. Nella fase post-mortem, la chiocciola continua a seccarsi e non si decompone.

Morte per annegamento: La chiocciola è completamente fuori dalla conchiglia, aumento del volume del corpo e piede, colore verdastro. Funzionalità motorie rallentate.

## 2.9. Possibili contaminazioni da metalli pesanti

La gran parte dei contaminanti vengono assunti dai gasteropodi per ingestione. In particolar modo, essi si concentrano nella ghiandola digerente, tale struttura ghiandolare, come già enunciato nel Capitolo I (Anatomia), è sede della produzione di enzimi digestivi, dell'assorbimento, della digestione ed endocitosi delle particelle di cibo, nonché coinvolta nell'immagazzinamento e nell'escrezione delle sostanze di rifiuto (Amaral et al., 2004). I metalli pesanti si depositano essenzialmente all'interno del tessuto connettivo, soprattutto nelle cellule del calcio,. Nello studio svolto da Amaral (2004), si è visto che le chioccioline appartenenti alla specie *Cornu aspersum*, vissute in ambienti contaminati da traffico urbano, presentavano maggiore ispessimento del tessuto connettivo a causa dell'accumulo di Cu e Fe in granuli all'interno dei rodociti i quali, tendono a svilupparsi in numero maggiore.

Le chioccioline sono capaci di inattivare i metalli come il cadmio e il rame legandoli a particolari proteine citoplasmatiche chiamate metallotioneine (Berger e Dallinger, 1997). Il Cd, assunto per via cutanea o per ingestione (Caeurdassier et al., 2002) colpisce principalmente la riproduzione, non permettendo lo sviluppo delle uova. Da

osservazioni morfologiche e dal peso degli organi genitali di chioccioline alimentate per circa 10 settimane con del cibo contaminato, si è verificata un'inibizione nello sviluppo delle gonadi. Se la concentrazione di Cd assunta aumenta la ghiandola dell'albume e l'ovospermidotto si atrofizzano (Gomot, 1997).

Inoltre, il Cd nei molluschi modifica l'attività locomotoria e respiratoria (Gomot, 1997). Alcuni metalli, come Mn, Cu, Zn e Ca possono essere assunti per contatto dell'epitelio del piede col terreno potenzialmente inquinato (Dallinger, 1993). I metalli entrano nelle cellule passivamente attraverso i canali cellulari seguendo il gradiente di concentrazione o per diffusione facilitata o in alcuni casi per endocitosi. Il rame è un metallo importante per i gasteropodi, in quanto è il costituente essenziale dell'emocianina ed è prevalentemente presente nel piede e nel mantello della chiocciola. La sua concentrazione deve essere mantenuta costante e in certi casi viene accumulato in concentrazioni maggiori a quelle presenti nell'ambiente (Laskowski et al., 1996). Nello studio di Laskowski, in cui si valutava l'accumulo di Zn, Pb, Cu e Cd, somministrati attraverso la dieta a *Cornu aspersum*, si è visto che lo Zn viene assimilato proporzionalmente alla concentrazione dell'esposizione e il Cd ha un'efficienza di assimilazione del 68-72%. Il Pb, invece viene trasferito verso il guscio, interferendo col metabolismo del calcio provoca un assottigliamento e successivo indebolimento (Beeby e Richmond, 2002). Da studi più recenti effettuati mediante la tecnica spettroscopica XAFS, si è visto che i metalli sono legati non solo alla struttura carbonatica del guscio ma anche alle componenti organiche (Yasoshima et al, 2001).

Infine, i meccanismi di detossificazione per eliminare i metalli in traccia o quelli non essenziali comprendono: ultrafiltrazione, meccanismi di trasporto attivo, inclusione in soluti che vengono espulsi con il muco o attraverso urea e acido urico.

## 2.10 Pest snail

Le specie alloctone, in particolare quelle che diventano invasive, hanno enormi conseguenze economiche e ambientali. Pimentel et al. (2005) stimano

annualmente i costi economici di circa 120 miliardi di dollari derivanti da specie straniere invasive solo negli Stati Uniti. I molluschi terrestri (Mollusca: Gastropoda) sono importanti parassiti economici in tutto il mondo, causando notevoli danni a vari tipi di colture e rappresentano un rischio per la salute sia per l'uomo che per la fauna selvatica.

I costi economici associati al controllo e al trattamento contro tali specie, sono legati all' impatto diretto riferito ai molluschi stessi, che creano problemi legati al grazing, al rilascio di residui fecali e bava e all'intasamento delle macchine da raccolta tutti fattori che contribuiscono a un abbassamento della qualità e della quantità del raccolto. In aggiunta, i costi possono essere associati a impatti indiretti, quali la trasmissione di parassiti e malattie associate, la contaminazione dei prodotti che può portare alla degradazione al momento della vendita o ancora più grave alla diffusione di patologie correlate.

In Europa, specialmente nei paesi del nord-ovest con climi temperati e molte precipitazioni, i gasteropodi terrestri sono gravi infestanti di seminativi (grano, colza di semi oleaginosi), colture di ortaggi (es., Lattuga, cavolini di Bruxelles) e giardini domestici (Porto e Porto, 1986; e Moens, 2002; Moens e Glen, 2002; Port e Ester, 2002). Nell'America settentrionale, attaccano piante di mais e soia, in particolare nei sistemi di piccole dimensioni (Hammond and Byers, 2002) tali specie sono inoltre responsabili della distruzione di agrumeti, in particolare in California (Sakovich, 2002) (Fig. 3). Negli Stati Uniti, Capinera (2001) riporta la sua distribuzione in California e lungo la costa occidentale a nord, nella Columbia Britannica, in Canada, nella maggior parte degli Stati del sud-est e lungo la costa orientale a nord del New Jersey. Tuttavia, non ha sviluppato lo stato di "parassita grave" come in California. Sebbene occasionalmente intercettato su spedizioni di piante in Florida, non ha raggiunto il grado di specie invasiva in questo stato.. Nell'America Centrale sono parassiti di fagioli (Rueda et al., 2002). In Africa molte specie, ma soprattutto *A. fulica*, è responsabile di gravi malattie a danno di una vasta gamma di colture (Mead, 1961; Raut e Barker, 2002). In Australasia, sono un problema nella creazione di pascoli in Nuova Zelanda (Barker, 2002b) e in Australia settentrionale sono diventate un problema molto sentito dai viticoltori (Sanderson e Sirgel, 2002) oltre a danneggiare interi appezzamenti di grano in Australia meridionale (Baker, 2002).

Inoltre, gli organismi patogeni vegetali (batteri e funghi) possono stabilirsi nei tessuti vegetali che sono stati danneggiati da gasteropodi (Godan, 1983).

L'interesse negli ultimi anni è aumentato soprattutto per le specie di chioccioline (ad esempio *Theba pisana*) o per le limacce *Arion hortensis* agg., *Deroceras reticulatum*, *Tandonia budapestensis* le quali sono considerate inoltre come importanti parassiti agricoli e orticoli (Glen and Moens, 2002). A causa della composizione corporea, per lo più costituita da tessuti molli altamente affini all'acqua, i gasteropodi terrestri sono limitati a vivere in habitat dove le condizioni rimangono umide per la maggior parte del tempo, ad esempio terreni pesanti e vegetazione densa. Sono più abbondanti su terreni argillosi non eccessivamente compatti, poiché tale tipologia di terreno tende a rimanere umida, e la struttura del suolo consente un più facile movimento dei gasteropodi sul suolo. Negli habitat naturali tali specie si nutrono attraverso un'ampia gamma di materiale vegetale disponibile, di solito piante erbacee e erbe. Molti gasteropodi mostrano una preferenza per alcune piante. Nel caso di *D. reticulatum* questi sono principalmente Leguminosae, Cruciferae e Compositae.

Il danno più grave al grano avviene presto dopo la semina, cibandosi dei meristemi apicali dei germogli in fase di crescita. Di conseguenza, le piante potrebbero non germogliare o perire poco dopo l'emersione dal terreno. Le zone predate nella coltura in crescita consentono la colonizzazione da parte di specie di erbe indesiderate, nonché la riduzione del rendimento complessivo.

### 2.10.1 Controllo chimico dei gasteropodi terrestri

La storia del controllo chimico dei gasteropodi terrestri ritenuti come piaga nell'agricoltura inizia già nel 1439 quando si utilizzavano primi prodotti (ad esempio, sale) per irritare gli animali in modo che essi deperissero perdendo i loro fluidi corporei (Konrad von Megenberg citato in South, 1992). Da allora sono state utilizzate molte altre sostanze per il controllo delle gasteropodi terrestri (la vasta letteratura citata in South, 1992; Henderson e Triebkorn, 2002; Bailey, 2002), ma attualmente sono approvati solo tre molluschi per il loro controllo :

- Metaldehyde (2,4,6,8-tetrametil-1,3,5,7, -tetroxocane): La metaideide è un polimero ciclico di acetaldeide, è il componente attivo nei molluscicidi utilizzati per il controllo di infestazioni da gasteropodi polmonati terrestri. E' un veleno irritante che provoca una intensa e violenta secrezione di muco, la quale porta alla morte per disidratazione. La metaldeide è utilizzata principalmente nelle colture a campo, nei campi di verdure, nelle colture di frutta, negli ornamenti e nelle colture in serra.. Questo agente neurotossico è stato associato all'avvelenamento in una varietà di specie animali domestici e della fauna selvatica, anche se la maggior parte degli avvelenamenti sono stati segnalati nei cani e sono legati ad un posizionamento errato dell'esca (South, 1992). La metaldeide può essere combinata con altri agenti come gli insetticidi a base di carbamato per migliorare l'efficacia. Non è considerata una sostanza chimica persistente. In circostanze tipiche di applicazione, la metaideide può rimanere efficace fino a 10 giorni (South, 1992).

- Metiocarb, sinonimi: Mercaptodimethur, Mesurol, Methiocarbe. Acaricida-insetticida non sistemico che agisce per contatto ed ingestione. É un insetticida convenzionale a base di carbamato con azione neurotossica ed è utilizzato principalmente nelle colture a campo (pomacee), nelle verdure, nei ribes nero e nelle fragole. Il metiocarb è il molluscicida più diffuso per il presidio nelle colture di cereali e nel 1990 è stato applicato al 79% della superficie complessiva dei cereali in cui sono stati utilizzati molluscicidi (Davis et al., 1991).

- Tiodicarb, introdotto commercialmente alla fine degli anni '80.

I suddetti prodotti chimici sono citati in letteratura come "molluscicidi altamente specifici", comunque, come sopra indicato, possono anche influenzare gli organismi non bersaglio. Le prove sul campo hanno anche indicato che esistono livelli di efficacia simili (Port e Port, 1986). Le valutazioni sul campo mostrano che il tiodicarb è efficace come il metiocarb (Ferguson et al., 1995). Studi sperimentali suggeriscono che il tiodicarb può dare un migliore controllo nelle condizioni umide e il metiocarb meglio in condizioni secche (Ferguson et al., 1995).

Uno dei principali problemi associati all'utilizzo di queste molecole per il controllo delle lumache è l'avvelenamento involontario di organismi non bersaglio. Inoltre, sia la metaldehyde che il metiocarb sono stati implicati nell'avvelenamento deliberato della fauna selvatica. La metaideide è tossica per i vertebrati e sono stati riportati diversi casi di avvelenamento in cani, gatti, pecore e pollame (Homeida e Cooke,

1982; Richardson et al., 2003). Il metiocarb è tossico per gli invertebrati benefici che sono predatori importanti di altri parassiti. Avvelenamento da pellet di metiocarb è stato riportato in invertebrati come i lombrichi (Bieri et al., 1989) e negli scarabei carabide (Buchs et al., 1989) e anche in vertebrati come le pecore (Giles et al., 1984) (Studdert, 1985). Inoltre, molti mammiferi selvatici (ad es. topi di campo, lepri e ricci) e negli uccelli (ad es. fagiani, aironi e raptors, compresi gli aquiloni rossi) sono noti per essere stati vittime di avvelenamento accidentale o deliberato da metiocarb (Giles et al., 1984; Greig-Smith et al., 1990; Fletcher et al., 1991; Fletcher et al., 1994).

È particolarmente difficile prevenire danni a cereali (specialmente prima della germinazione) e nonostante l'uso diffuso di esche molluschicide (Glen e Wiltshire, 1992) è probabile che solo un 10% di una popolazione di gasteropodi polmonati terrestri può essere distrutta usando tali metodi (Fromming e Plate, 1952).

## Capitolo III - Patologie in *Theba pisana* e *Cornu aspersum* in ambiente naturale e in allevamento intensivo

Nell'ambito della ricerca effettuata nel periodo 2015-2017, abbiamo potuto analizzare numerosi episodi di mortalità di massa verificatisi sia in ambiente naturale (*Theba pisana*) che in allevamento intensivo (*Cornu aspersum*). Il resoconto di tali indagini è riportato nei due studi che seguono: il primo studio è

stato effettuato su *T. pisana* (J. Invertebrate Pathology vol 148, September 2017, Pages 10-13); il secondo su *Cornu aspersum* (Atti SISVET, 2017)

### 3.1 - Prime Osservazioni su un agente infettivo di probabile natura virale in *Theba pisana* (Gastropoda: Pulmonata).

#### 3.1.1 Riassunto

*Theba pisana* (Mollusca: Helicidae) è ritenuta un parassita agricolo introdotto in molti paesi di tutto il mondo, tra cui Australia, Israele, USA e Sudafrica. Tale specie è inoltre un ospite intermedio di parassiti di importanza sia medica che veterinaria. In questo studio, una popolazione naturale di *T. pisana* della costa domitiana (in provincia di Caserta) è stata analizzata a seguito di un evento di mortalità di massa. Alla microscopia ottica, il 30% degli individui raccolti hanno mostrato nelle cellule del calcio della ghiandola digerente la presenza di nuclei ipertrofici contenenti corpi inclusi eosinofili e debolmente basofili. L'esame ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) ha mostrato inclusioni nucleari costituite da uno stroma reticolato in cui erano presenti organismi virus-like ( $38 \pm 4$  nm di diametro). Secondo le nostre conoscenze, questa potrebbe essere la prima prova di un agente virale che infetta un gasteropode polmonato, *T. pisana*, e che può aprire nuove prospettive di controllo biologico di questo parassita in tutto il mondo.

#### 3.1.2 Introduzione

A seguito di un evento di mortalità di massa registrato nel maggio 2016, in una zona parallela alla linea costiera (100 m di lunghezza × 50 m) sulla riva sinistra del fiume Volturno (Regione Campania - Italia) (13 ° 55'52"E, 41 ° 01'17"N), chioccioline della specie *T. pisana* sono state raccolte per un'indagine preliminare istopatologica. Sul sito di prelievo dei campioni, risultava presente una grande quantità di conchiglie vuote di tale specie disseminate sul terreno, gli esemplari vivi si trovavano in stretta associazione fra loro, aggregati sui rami delle piante che costituivano la flora endemica del luogo (prevalentemente *Inula viscosa*). Per avere

un dato relativo al controllo, sono stati raccolti esemplari provenienti da un'altra zona distante nel sud della regione, litorale di Paestum (SA) (40°24'39.7"N 14°59'27.0"E).

### 3.1.3 Materiali e metodi

Un totale di 100 campioni sono stati fissati in formalina al 4% e incorporati in paraffina (Bioptica, Italia). Le sezioni, di spessore di 2-3  $\mu\text{m}$ , sono state effettuate con microtomo e colorate con Ematossilina/Eosin per un esame preliminare. Dopo essere stati osservati al microscopio ottico, sono stati selezionati gli esemplari che presentavano corpi inclusi nucleari in cellule della ghiandola digerente e sezioni aggiuntive per ogni caso sono state colorate con Feulgen Pycromethyl blue Reaction (FPM) per evidenziare la presenza di DNA (Howard et al. , 2004). Infine, per eseguire un'analisi ultrastrutturale, porzioni di tessuto contenenti le inclusioni sono state rimosse dai blocchi di paraffina con un bisturi secondo il protocollo di Ruiz et al. (2011). La paraffina è stata rimossa attraverso diversi risciacqui in xilene e successiva agitazione al vortex e centrifugazione a 15000 giri. Il tessuto è stato immerso in 2,5% di glutaraldeide, postfissato al 2% di tetrossido di osmio ( $\text{OsO}_4$ ) e incorporato in Epon. Le sezioni ultra sottili sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo ed esaminati al microscopio elettronico a trasmissione, modello JEOL JEM 1011 (TEM) a 80 kV. 78.

### 3.1.4 Risultati e discussione

Ad una prima analisi macroscopica, dei 100 esemplari di *Theba pisana*, provenienti dall'area in oggetto di studio, solo alcuni mostravano una lieve decolorazione della ghiandola digerente. Non sono stati osservati altri segni macroscopici evidenti.

Tra gli individui ispezionati, 30 presentavano infezioni a livello delle cellule del calcio. Tali cellule mostravano nuclei ipertrofici che contenevano corpi di inclusi eosinofili o debolmente basofili, positivi per la reazione di Feulgen, spesso circondati da un margine chiaro (Fig.1A e B – Vedi pubblicazione Allegato 1). Ad un maggiore ingrandimento, le inclusioni nucleari mostravano un aspetto finemente reticolato, ben visibile su sezioni sottili (inserto Fig.1A, Fig. 2 - Vedi pubblicazione

Allegato 1). Frequentemente, le cellule del calcio colpite risultavano rigonfie e vacuolate. Inoltre, era evidente l'infiltrazione interstiziale emocitaria nelle zone infette, con conseguente infiammazione della ghiandole digerenti. L'esame ultrastrutturale ha confermato la posizione intranucleare delle inclusioni: queste ultime erano costituite da uno stroma virogenico reticolato composto da materiale elettrone-denso (Fig. 2B e C – Vedi pubblicazione in allegato).

Le particelle simili a virus presentavano un aspetto rotondeggiante di tipo icosaedrico (Fig. 2C), con una dimensione di circa  $38 \pm 4$  nm di diametro (media  $\pm$  SD, gamma = 29-50 nm, n = 50 ). Del campione di controllo (20 individui) nessun individuo ha mostrato alcuna infezione.

Dal momento che non risulta letteratura a supporto che descrivesse simili condizioni patologiche nei gastropodi polmonati, abbiamo ritenuto utile fare un confronto con i dati provenienti da membri di altre famiglie di molluschi.

Le caratteristiche istologiche, istochemiche e ultrastrutturali descritte in questo studio sono coerenti con risultati simili osservati nell'epitelio ghiandolare digerente del bivalve marino *Ensis arcuatus* (Ruiz et al., 2011) e con la cosiddetta ipertrofia gametocitica virale delle ostriche (Garcia et al ., Mayers et al., 2009). In tutti i casi sopra descritti, le lesioni sono state caratterizzate dalla presenza di corpi inclusi intranucleari contenenti particelle simili a virus (30-60 nm). Alte concentrazioni di tali particelle si sono osservate nei nuclei infetti, e la forte reazione Feulgen in tali nuclei fornisce la prova presuntiva che queste particelle contengano DNA.

Le indagini molecolari non sono ancora state eseguite, ma il sequenziamento (profondo) del tessuto interessato dovrebbe rivelare la natura dei presunti virus.

Pertanto, sulla base di prove morfologiche, i virus registrati sono stati catalogati come Papillomaviridae o Polyomaviridae (Bernard et al., 2011; Norkin et al., 2011). Tuttavia, nel nostro caso, non era possibile assegnare definitivamente il nostro agente virale putativo a qualsiasi famiglia virale conosciuta sulla base di dati morfologici disponibili. Infatti, il diametro misurato del nostro agente virale non coincide con quelli riportati per Papillomaviridae (circa 55 nm) (Bernard et al., 2011) o per Polyomaviridae (40-45 nm) (Norkin et al., 2011) e Hepadnaviridae (42-50 nm) (Mason et al., 2011). D'altra parte, l'aspetto reticolato ultrastrutturale dei corpi inclusi osservati nel nostro studio, si trova anche nelle cellule infette da alcune specie della famiglia Baculoviridae, come il nucleopoièdrovirus di alcuni insetti

(Kelly, 1981; Young et al., 1993 ). In questi casi, le proteine virali coinvolte nella replicazione virogenica sembrano essere responsabili della peculiare architettura reticolare dei corpi inclusi (Nagamine et al., 2011). Tuttavia, virioni a forma di bacchetta non sono stati identificati nei nostri casi. Lo screening dei database transcriptomici di *T. pisana* non hanno dimostrato la presenza di ceppi virali di tipo Papilloma o di Poliomavirus.

Quindi, per una corretta identificazione della tipologia del ceppo virale, i nostri dati descrittivi dovrebbero essere completati con metodi diagnostici più sofisticati. Attualmente non risulta possibile creare colture cellulari di *Theba pisana* per effettuare colture di virus, la strategia diagnostica potrebbe includere la purificazione del virus secondo i metodi descritti per altri molluschi seguiti dalla sequenza dei genomi virali (Le Deuff e Renault, 1999, Yozwiak et al., 2012) e ibridazione dei tessuti infetti. Inoltre, la trasmissione della malattia usando filtrati di tessuti infetti o particelle purificate a lumache sane dovrebbe essere effettuata previa dimostrazione del postulato di Koch.

### 3.2 - Mortalità di massa di *Cornu aspersum* in allevamenti italiani: un'indagine istopatologica e molecolare

Lo studio dei gasteropodi polmonati ha una rilevanza sempre crescente nella ricerca biomedica. L'allevamento di *Cornu aspersum* è una delle più importanti attività commerciali in Europa. Tali gasteropodi sono inoltre ospiti intermedi e vettori di diversi agenti patogeni per l'uomo e per gli animali (Giannelli et al. 2015). Si stima che almeno 300 milioni di persone che vivono in aree socialmente svantaggiate, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, soffrono di malattie debilitanti e spesso mortali trasmesse da questi vettori. Questi includono Schistosomiasis, Echinostomiasis, Fascioliasis, Fasciolopsiasis, Paragonimiasis, Opisthorchiasis,

Clonorchiasis e Angiostrongyliasis. I cambiamenti climatici globali, il commercio internazionale di chioccioline per alimentazione e la migrazione di popoli e animali, stanno cambiando i modelli e le dinamiche geografiche di alcune SBD, a causa dei potenziali vettori e della ridistribuzione degli agenti patogeni (Martens, 1995). Pertanto, le SBD stanno ora emergendo anche in aree precedentemente considerate libere, tra cui l'Europa. Un recente articolo di Adema et al. (2012), sottolinea la necessità di uno sforzo globale nella ricerca fondamentale e applicata per eliminare le SBD negli esseri umani e negli animali. Oggi alcune specie di lumache vengono consumate da milioni di persone in tutto il mondo (Parlapani, Neofitou e Boziaris, 2014). In questo contesto, la conoscenza della biologia e della patologia di questi animali è fondamentale per comprendere l'interazione tra ospite e patogeno, le vie di trasmissione delle patologie (Giannelli et al., 2015) e per eseguire una gestione efficiente delle aziende e azioni sanitarie preventive collegate alle misure di controllo. Per questo motivo, abbiamo realizzato un'indagine istopatologica sulle malattie registrate in *Cornu aspersum* in allevamento intensivo. Esaminiamo esemplari da 13 casi di mortalità di massa (perdita del 90-100% nel 2017) dall'Italia settentrionale, centrale e meridionale.

I risultati ottenuti rappresentano i primi dati di base in questo campo in Italia.

### 3.2.1 Materiali e metodi

Dopo un resoconto di eventi di mortalità di massa abbiamo raccolto un totale di 240 esemplari di *Cornu aspersum* in 13 allevamenti di chioccioline, dall'Italia meridionale (Sicilia), centrale (Lazio) e settentrionale (Lombardia).

Previa anestesia, ad ogni individuo è stata asportata l'intera massa viscerale rimuovendo le conchiglie, il contenuto, così raccolto, è stato fissato in formalina al 10% e successivamente processato per le ulteriori indagini istopatologiche.

Per lo studio istologico, le sezioni sono state colorate con i seguenti metodi: Ematossilina/Eosina, Fulgen, Macchiavello, Giemsa e Gram. Due campioni ottenuti da individui aventi lesioni alla ghiandola digerente compatibili con presenza di colonie RLO nelle cellule del calcio per la diagnostica molecolare. È stato utilizzato un protocollo di estrazione da paraffina per il tessuto di interesse secondo Wirgin et

al. (1997). Successivamente è stata effettuata un' amplificazione del 16S (Woo et al. 2003) per un frammento di 540 bp. I prodotti ottenuti sono stati inviati a sequenza diretta.

### 3.2.2 Risultati

Le lesioni sono state prevalentemente localizzate alla ghiandola digerente (DG) e risultano prevalentemente caratterizzate da alterazioni regressive (degenerazione e necrosi) e da infiammazioni (infiltrati, noduli o capsule emocitarie).

Nel 70% dei casi, le lesioni sono state associate a organismi RL, mentre nel restante 30% a infezioni da protozoi, insieme a un consorzio di batteri Gram +/-.

Negli individui affetti da RLO localizzati prevalentemente a livello della ghiandola digerente, sono stati osservati due tipi morfologici di lesioni associate: in campioni provenienti dall'Italia meridionale (Sicilia), RLO erano localizzati solo a livello delle cellule della ghiandola digerente e sono stati associati a cambiamenti regressivi della stessa; al contrario, in campioni provenienti dall'Italia centrale (Lazio) e settentrionale (Lombardia), gli organismi RLO si localizzavano selettivamente nelle cellule di calcio (CC) e sono state accompagnate da infiammazione nodulare della DG. L'infezione protozoaria si è verificata principalmente nel rene, nell'intestino e

nei campioni del Lazio nella ghiandola digerente, con conseguente infiammazione di tipo infiltrativo sia nodulare che capsulare della stessa.

L'analisi in Blast ha dato identità del 99-100% per differenti gruppi di Enterobacteriaceae:

La storia evolutiva è stata analizzata usando il metodo di Maximum Likelihood basato sul modello di Tamura a 3 parametri (Tamura K et al.; 1992 ). Per la ricostruzione su base filogenetica e la rappresentazione della storia evolutiva dei taxa analizzati, sono stati presi in esame dati provenienti dall'inferenza di 1000 repliche attraverso il test del "Bootstrap consensus tree" (Felsenstein J. Et al.; 1985). I nodi corrispondenti a meno del 50% dei replicati non sono stati presi in considerazione. La percentuale di alberi simulati in cui i taxa associati convergono, sono stati presentati in linea con le diramazioni dell'albero filogenetico. L'analisi ha

coinvolto 14 sequenze nucleotidiche. Sono state riscontrate un totale di 303 posizioni nel dataset finale. Le analisi evolutive sono state condotte in MEGA7 (Kumar S., Stecher G., and Tamura K. ; 2016; Fig. 3).

### 3.2.3 Discussione

Nei casi di mortalità di massa associati a RLO osservati in Lombardia, Lazio e Puglia gli studi molecolari mettono in evidenza la presenza nella ghiandola digerente esclusivamente di Gamma proteobatteri del genere *Enterobacter*.

Bisogna considerare che in condizioni normali la ghiandola digerente non è colonizzata da batteri di alcun tipo e quindi anche la sola presenza di batteri nella ghiandola digerente rappresenta un'anomalia.

Inoltre in nessun caso sono state evidenziate colonie batteriche all'interno delle cellule della ghiandola digerente.

Nei nostri casi la presenza di colonie intracellulari rappresenta certamente un elemento patologico degno di nota, che insieme al quadro infiammatorio che

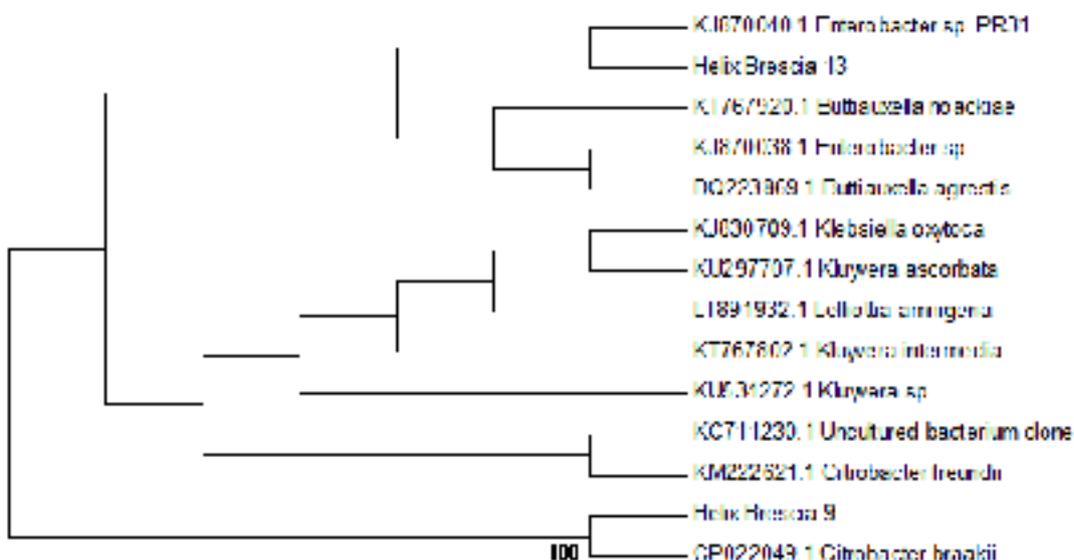


Fig. 3: Analisi Filogenetica molecolare secondo il metodo del "Maximum Likelihood"

accompagnava tale presenza, suggerisce un ruolo patogenetico svolto da questi batteri nel contesto dei casi di mortalità di massa osservati.

In particolare la presenza di colonie batteriche, all'interno delle cellule del calcio, supporta l'ipotesi di una alterazione funzionale di quest'ultime che, come noto, svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'osmolarità e dell'adattamento alle alte temperature nei gasteropodi polmonati, entrambe funzioni vitali per tali animali.

I risultati molecolari supportano infine l'ipotesi che le lesioni osservate si inseriscano in un quadro sostanzialmente dismicrobico caratterizzato dalla prevalenza di Enterobacteri contrariamente a quanto osservato in animali sani nei quali prevalgono per lo più Firmicutes.

## 4. Considerazioni conclusive

Data l'enorme mole di campioni e di dati da sviluppare, tale studio non può ritenersi esaurito con i risultati presentati, che necessitano di ulteriori approfondimenti pluriennali sia sul piano ultrastrutturale che sul piano molecolare.

Tuttavia i nostri dati rappresentano il primo vero tentativo di studio sistematico a livello mondiale sulla eziopatogenesi dei casi di mortalità di massa dei gasteropodi polmonati terrestri e fornisce linee guida utili per successivi studi di carattere diagnostico.

## 5. Pubblicazioni allegare

### 5.1 Allegato 1



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jip](http://www.elsevier.com/locate/jip)

## Short Communication

Early evidence for a virus-like agent infecting the pest snail *Theba pisana* (Gastropoda: Pulmonata) in Southern ItalyGionata De Vico<sup>a,\*</sup>, Rosarita Tatè<sup>b</sup>, Nicola Maio<sup>a</sup>, Andrea Costantino<sup>a</sup>, Vincenzo Guida<sup>c</sup>, Grazia Villari<sup>a</sup>, Francesca Carella<sup>a</sup><sup>a</sup> University of Naples Federico II, Dept. of Biology, Complesso Universitario di MS Angelo, Via Cinthia, ed.7, 80126 Naples, Italy<sup>b</sup> Integrated Microscopy Facility, Institute of Genetics and Biophysics "Adriano Buzzati Traverso", CNR, Via Pietro Castellino, 111, 80131 Naples, Italy<sup>c</sup> The Second University of Naples, Dept. of Experimental Medicine, Naples, Italy

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Virus-like agent  
Gastropods  
Mass mortality  
Inclusion bodies  
*Theba pisana*

## ABSTRACT

The Mediterranean land snail *Theba pisana* (Mollusca: Helicidae) is an introduced agricultural pest in many countries around the world, including Australia, Israel, USA and South Africa. In addition, this snail is an intermediate host of parasites of importance in both human and veterinary medicine. In this study, a natural population of *T. pisana* snails on the Domitian coast of Italy was surveyed following a mass mortality event. By light microscopy, 30% of the collected individuals showed in the calcium cells of the digestive gland the presence of hypertrophied nuclei containing eosinophilic to weakly basophilic inclusion bodies. Ultrastructural examination by transmission electron microscopy (TEM) showed nuclear inclusions constituted by a reticulated stroma into which unenveloped, roundish virus-like particles ( $38 \pm 4$  nm in diameter) were present. To the best of our knowledge this could be the first evidence for a virus-like agent infecting the gastropod *T. pisana*, which may open new biocontrol perspectives of this pest worldwide.

## 1. Introduction

The land snail *Theba pisana* (Mollusca: Helicidae) is a pulmonate gastropod native of the Mediterranean and Western Europe, where it is generally found in coastal dune habitats (Johnson, 1988). However, in Australia, Israel, and USA this snail is considered an introduced agricultural pest to cereals, legumes, pastures, vineyards and vegetables (Baker, 1986). In South Africa it was held responsible for the extermination of native snail species, possibly as a result of competition for available food (Odendaal et al., 2008). Furthermore *T. pisana* is an intermediate host of parasites of importance in both veterinary and human medicine (Grewal et al., 2003), such as the nematode lungworm *Müellerius capillaris* (Müller), an important parasite of sheep and cattle (Baker, 1986; Salmon et al., 1996), and the trematode *Brachylaima cribbi*, a human pathogen (Butcher and Grove, 2001). Bacteria, fungi, parasites and even insects have been advocated as possible biological agents for controlling the population expansion of *T. pisana* in non-native habitats and to reduce the impact of gastropods on agriculture as well as on human and animal health. Unfortunately, in the field of biological control of invading mollusk species the effect of viruses on pulmonate mollusks is a most neglected area of research (Sallam and El-Wakeil, 2012). Moreover the literature dealing with viruses infecting

mollusks seems to be limited to reports involving primarily aquatic bivalves and non-pulmonate gastropods (Elston, 1997; Mayers et al., 2009; Renault, 2011). To the best of our knowledge no viruses infecting pulmonate terrestrial gastropods have yet been described. In this paper we report nuclear inclusion bodies containing virus-like particles in the digestive gland epithelium of the pulmonate gastropod *T. pisana*. The presence of such a virus agent was associated with a mass mortality event in a natural snail habitat.

## 2. Materials and methods

Following a mass mortality event recorded by local people, *T. pisana* snails were collected for a preliminary histopathological survey, on May 2016, from an area parallel to the coastline (100 m long × 50 m large) on the left bank of the Volturno River mouth, in the Domitian coast environmental region (Campania Region, south of Italy) (13°55'52"E, 41°01'17"N). In that area mass mortality occurred in between the embryonic dunes and the brackish ponds behind the dunes, where snails clustered predominantly on *Inula viscosa* plants. No moribund snails were recognized. However, a great quantity of empty shells was found on the ground, while a few live snails were still clustered on the plants. Snails from another, distant area in the south of region

\* Corresponding author.

E-mail address: [gionata.devico@unina.it](mailto:gionata.devico@unina.it) (G. De Vico).<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.05.005>

Received 15 September 2016; Received in revised form 8 May 2017; Accepted 10 May 2017

Available online 11 May 2017

0022-2011/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

(40°25'19.7"N, 14°59'07.7"E) were additionally collected as control. Specimens were fixed in 4% formalin and embedded in paraffin wax (Bioptica, Italy). Sections (2–3 µm thick) were cut and stained with hematoxylin-eosin for routine examination. After being observed by light microscopy, the specimens affected by showing nuclear inclusion bodies in epithelium cells of the digestive gland were selected and additional thin sections per each case were stained with Feulgen Pycromethyl blue Reaction (FPM) to highlight DNA presence (Howard et al., 2004). Finally, to perform an ultrastructural analysis, portions of tissue containing the inclusions were removed from the paraffin blocks with a scalpel according to Ruiz et al. (2011). Paraffin was removed by several rinses in xylene with agitation. Tissue was placed in 2.5% glutaraldehyde, postfixed in 2% OsO<sub>4</sub>, and embedded in Epon. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a JEOL JEM 1011 transmission electron microscope (TEM) at 80 kV. 78.

### 3. Results and discussion

Hundred snails from the infected area were investigated. Macroscopically only a few animals showed a slight discoloration of the digestive gland. No other macroscopic signs were observed. According to Dimitriadis (Barker, 2001), by light microscopy normal digestive gland epithelium is composed of three type of cells: digestive cells, calcium cells and excretory cells (Fig. 1A and B). Among the inspected individuals, 30 presented infection at the calcium cell level. These cells showed hypertrophied nuclei containing eosinophilic to weakly basophilic inclusion bodies, which were positive for Feulgen's reaction and were frequently surrounded by a clear halo and chromophilic margins (Fig. 1A and B). At higher magnification, nuclear inclusions showed a finely reticulated appearance, well visible on thin sections (insert Fig. 1A; Fig. 2A). Frequently, affected calcium cells were swollen and vacuolated. Moreover, haemocytic interstitial infiltration of infected glands, resulting in digestive gland inflammation, was evident. Ultrastructural examination confirmed the intranuclear position of the nuclear inclusions: the latter were constituted by a reticulated virogenic-like stroma composed of an electron-dense matter with electron-lucent intrastromal spaces into which virus-like particles grow out from the edge of the stromal matter (Fig. 2B and C). The virus-like particles were apparently unenveloped, with a rounded appearance suggesting icosahedral symmetry (insert Fig. 2C), and with a size of about  $38 \pm 4$  nm in diameter (mean  $\pm$  SD, range = 29–50 nm,  $n = 50$ ). No snails collected from control areas showed any evidence of infection (20 individuals studied).

We could not find literature describing similar pathological conditions in pulmonate gastropods. Thus, we can only make a comparison with data from members of other mollusk families. The histological, histochemical and ultrastructural features described in this report are consistent with similar findings observed in digestive gland epithelium of the marine bivalve *Ensis arcuatus* (Ruiz et al., 2011), and as so-called viral gametocytic hypertrophy of oysters (Garcia et al., 2006; Mayers et al., 2009). In all above cases the lesions were characterized by the presence of intranuclear inclusion bodies containing virus-like particles (30–60 nm). High concentrations of such particles occurred in infected nuclei, and the strong Feulgen reaction in such nuclei provides presumptive evidence that these particles contained DNA. Molecular investigations are not yet performed, but (deep) sequencing of affected tissue should reveal the nature of the presumed viruses.

Thus, based on morphological evidence, the recorded viruses may belong to the *Papillomaviridae* or *Polyomaviridae* (Bernard et al., 2011; Norkin et al., 2011). However, in our case, it was not possible to definitively assign our putative viral agent to any viral known family on the basis of solely available morphological data. In fact, the measured diameter of our putative viral agent, does not fit with those reported for *Papillomaviridae* (about 55 nm) (Bernard et al., 2011), and is just a little smaller than *Polyomaviridae* (40–45 nm) (Norkin et al., 2011) and

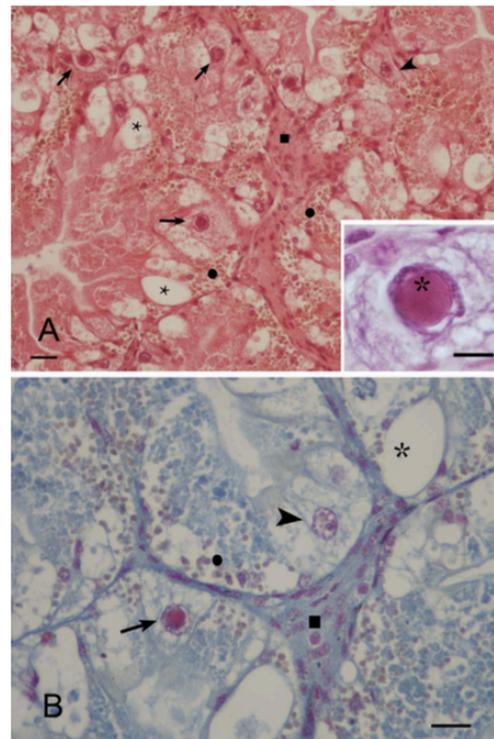


Fig. 1. (A) *T. pisana*, digestive gland. Normal calcium cells (arrowhead), digestive cells (black dots) and excretory cells (stars) are visible; calcium cells with nuclear inclusion bodies are also evident (arrows) along with haemocyte infiltrates (black square) (HE). Scale bar: 50 µm; Insert: enlarged view of an inclusion body: note the chromatin layer and the clear halo surrounding the inclusion body. The latter is eosinophilic and display a finely reticulated appearance. Scale Bar: 10 µm. (HE). (B) *T. pisana*, digestive gland. Feulgen's Pycromethyl blue reaction. Normal calcium cells (arrowhead), digestive cells (black dots) and excretory cells (stars) are visible; A calcium cell with Feulgen's positive nuclear inclusion body is also evident (arrows) along with haemocytes infiltrates (black square). Scale Bar = 50 µm, HE.

*Hepadnaviridae* families (42–50 nm) (Mason et al., 2011). On the other hand, the ultrastructural reticulated appearance of the inclusion bodies observed in our study, is also found in cells infected by some species of the *Baculoviridae* family, such as the nucleopolyhedrovirus of some insects (Kelly, 1981; Young et al., 1993). In those cases, viral proteins involved in viral replication seem to be responsible for the peculiar reticulated architecture of the inclusion bodies (Nagamine et al., 2011). However, rod-shaped virions have not been identified. Screening of *T. pisana* transcriptomic databases did not readily signal papilloma- or polyomaviruses. Thus, for a correct virus identification our current descriptive data should be supplemented with more sophisticated diagnostic methods, such as deep sequencing. Since mollusk cell lines for virus cultivation are not available, the diagnostic strategy could include virus purification according to methods described for other mollusk followed by sequencing of the viral genomes (Le Deuff and Renault, 1999; Yozwiak et al., 2012) and in situ hybridization of affected tissue. Furthermore, transmission of the disease using filtrates of infected tissues or purified particles to healthy snails should prove Koch's postulate.

Mass mortality has been sometimes seasonally observed in wild populations of *T. pisana* worldwide and this is usually thought to be caused by extreme climate conditions (Odendaal et al., 2008; Baker and Vogelzang, 1988). However, the results of the present study suggest

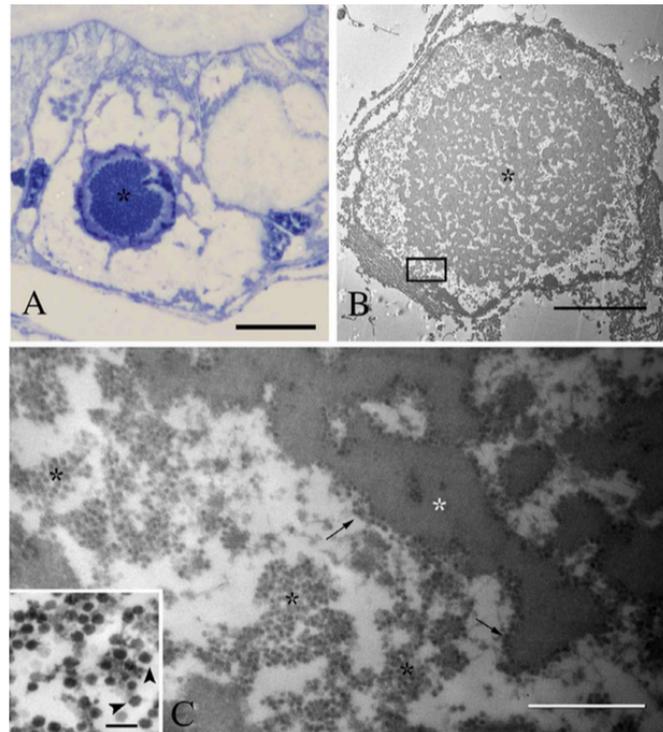


Fig. 2. (A) *T. pisana*, digestive gland. Thin section: note the fine reticulated structure of the inclusion body within the nucleus of a calcium cell. Toluidine blue, Scale Bar: 10  $\mu$ m. (B) Ultrastructural appearance of the inclusion body within the nucleus of a Calcium cell. Note the reticulated appearance of the virogenic stroma (star); Scale Bar 5000 nm. The rectangle in the figure indicate the area included in the enlarged view in C; (C) virus-like particles (black asterisk) are visible in the area included between the virogenic stroma of the inclusion bodies (white asterisk) and the nuclear envelope; roundish and virus-like particles grow from the edge of the stromal matter and within the intrastromal spaces (arrows). Scale bar = 500 nm; Insert: enlarged view of the virus-like particles, seem to have an icosahedral appearance (arrowheads). Scale bar: 50 nm.

that a putative viral infection may have contributed to the observed mortality in our case. The calcium cells, which are selectively affected by the observed virus-like agent, are known to be critically involved in the adaptation of land snails to extreme temperatures, as these cells control the osmoregulation and the acid-base balance of gastropods (Dittbrenner et al., 2009). According to Loker (2010) the extent of challenge posed by viruses and the nature of the gastropod anti-viral response, are almost completely unknown. In this context, recent studies on multiple genes related to anti-viral immunological response in *T. pisana* tissues (Zhao et al., 2016) have recognized an enrichment of viral disease-related pathways. This may provide further clues in the future for the putative interactions of viruses with gastropod snails, and may help to unravel the pathogenic role of the viral agent detected in our study. Internal defence mechanisms of mollusks against pathogens are primarily due to circulating cells known as haemocytes, which are the effector cells of mollusks inflammation (De Vico and Carella, 2012; Carella et al., 2015). Viral challenge of gastropods haemocytes results in transcriptional modulation of immune-related genes (Elvitigala et al., 2013). Thus, in our case the inflammatory response observed in the infected digestive gland of *T. pisana* may be part of an antiviral response of haemocytes in infected individuals. Whether the observed infections and related digestive gland injury are sufficient to cause mortality, or contribute to lowering the resistance of the affected snail populations to climatic or other unknown environmental factors should be clarified by further studies. Baker (1986) and Baker and Vogelzang (1988) underlined the relevance of importing natural enemies of *T. pisana* from

Europe into non-native snail habitats as tools, that could perhaps reduce alien pest snail numbers. Thus, in our case the ability of the observed viral agent to infect healthy snails is even more relevant in view of its potential as pest control agent. For that reason, further ultrastructural, molecular and pathological studies are in progress in our lab, in order to clarify the infectious nature and biology of this interesting virus-like agent.

#### Acknowledgments

The authors acknowledge and thank Mr Luigi Boscolo, citizen of Castel Volturno (Caserta Province), for helping in sampling.

#### References

- Baker, G.H., 1986. The biology and control of white snails (Mollusca: Helicidae), introduced pests in Australia. CSIRO, Australia, Division of Entomology Technical Paper 25, pp. 1–31.
- Baker, G.H., Vogelzang, B.K., 1988. Life history, population dynamics and polymorphism of *Theba pisana* (Mollusca: Helicidae) in Australia. *J. Appl. Ecol.* 25 (3), 867–887.
- Bernard, H.-U., Burk, R.D., deVilliers, E.-M., zur Hausen, H., 2011. Family papillomaviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 235–248.
- Butcher, A.R., Grove, D.L., 2001. Description of the life-cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. *Syst. Parasitol.* 49, 211–221.
- Carella, F., Feist, S.W., Bignell, J.P., De Vico, G., 2015. Comparative pathology in bivalves: aetiological agents and disease processes. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 107–120.

- De Vico, G., Carella, F., 2012. Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Res. Vet. Sci.* 93, 1109–1115.
- Dimitriadis, V.K., 2001. The digestive system of Stylommatophora. In: Barker, G.M. (Ed.), *The Biology of Terrestrial Molluscs*. CAB Intern., pp. 237–257.
- Dittbrenner, N., Lazzara, R., Köhler, H.R., Mazza, C., Capowiez, Y., Triebkorn, R., 2009. Heat tolerance in Mediterranean land snails: histopathology after exposure to different temperature regimes. *J. Mollus. Stud.* 75, 9–18.
- Elston, R., 1997. Special topic review: Bivalve mollusc viruses. *World J. Microb. Biotechnol.* 13, 393–403.
- Elvittigala, D.A., Premachandra, H.K.A., Whang, I., Nam, B.-H., Lee, J., 2013. Molecular insights of the first gastropod TLR counterpart from disk abalone (*Haliotis discus discus*), revealing its transcriptional modulation under pathogenic stress. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 334–342.
- Garcia, C., Robert, M., Arzul, I., Chollet, B., Joly, J.P., Miossec, L., Comtet, T., Berthe, F., 2006. Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France: from occasional records to disease emergence? *Dis. Aquat. Organ.* 70, 193–199.
- Grewal, P.S., Grewal, S.K., Tan, L., Adams, B.J., 2003. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. *J. Nematol.* 35, 146–156.
- Howard, D.H., Lewis, J.L., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. NOAA Tech. Memorandum NOS NCCOS 5, 218.
- Johnson, M.S., 1988. Founder effects and geographic variation in the land snail *Theba pisana*. *Heredity* 61, 133–142.
- Kelly, D.C., 1981. Baculovirus replication: electron microscopy of the sequence of infection of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus in Spodoptera. *J. Gen. Virol.* 52, 209–219.
- Le Deuff, R.-M., Renault, T., 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* followed by sequencing of viral genome. *J. Gen. Virol.* 80, 1317–1322.
- Loker, E.S., 2010. Gastropods immunobiology. In: In: Söderhäll, K. (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology – Invertebrate Immunity*, vol. 708. Springer, US, pp. 17–43.
- Mayers, T.R., Burto, T., Evans, W., Starkey, N., 2009. Detection of viruses and virus-like particles in four species of wild and farmed bivalve molluscs in Alaska, USA, from 1987 to 2009. *Dis. Aquat. Organ.* 88, 1–12.
- Mason, W.S., Gerlich, W.H., Taylor, J.M., Kann, M., Mizokami, T., Loeb, D., Sureau, C., Magnus, L., Norder, H., 2011. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 444–455.
- Nagamine, T., Abe, A., Suzuki, T., Dohmae, N., Matsumoto, S., 2011. Co-expression of four baculovirus proteins, IE1, LEF3, P143, and PP31, elicits a cellular chromatin-containing reticulate structure in the nuclei of uninfected cells. *Virology* 417, 188–195.
- Norkin, L.C., Allander, T., Atwood, W.J., Buck, C.B., Garcea, R.L., Imperiale, M.J., John, R., Major, E.O., Pipas, J.M., Ramqvist, T., 2011. In: King, A.M.Q., Adams, J.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 279–290.
- Odendaal, L.J., Haupt, T.M., Charles, L., 2008. The alien invasive land snail *Theba pisana* in the West Coast National Park: Is there cause for concern? *Koedoe* 50, 93–98.
- Renault, T., 2011. Virus affecting marine molluscs. In: In: Hurst, C.J. (Ed.), *Studies in viral ecology: Animal Host Systems*, vol. 2. John Wiley & Sons Inc, First Edition, pp. 153–175 (Chapter 6).
- Ruiz, M., Darriba, S., Rodríguez, R., Iglesias, D., Lee, R., López, C., 2011. Viral basophilic inclusions in the digestive gland of razor clams *Ensis arcuatus* (Pharidae) in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.* 94, 239–241.
- Sallam, A., El-Wakeil, N., 2012. Biological and ecological studies on land snails and their control. In: Soloneski, S. (Ed.), *Integrated Pest Management and Pest Control – Current and Future Tactics*. InTech, pp. 413–444 ISBN: 978-953-51-0050-8.
- Salmon, A., Paperna, I., Markovics, A., 1996. The influence of aestivation in land snails on the larval development of *Muellerius capillaris* (Metastrongylidae: Protostrongylidae). *Int. J. Parasitol.* 26, 363–367.
- Young, J.C., MacKinnon, E.A., Faulkner, P., 1993. The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of Spodoptera frugiperda cells in vitro infected by Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Struct. Biol.* 110, 141–143.
- Yozwiak, N.L., Skewes-Cox, P., Stenglein, M.D., Balmaseda, A., Harris, E., et al., 2012. Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2), e1485. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001485>.
- Zhao, M., Wang, T., Adamson, K.J., Storey, K.B., Cummins, S.F., 2016. Multi-tissue transcriptomics for construction of a comprehensive gene resource for the terrestrial snail *Theba pisana*. *Sci. Rep.* 6, 20685. <http://dx.doi.org/10.1038/srep20685>.

- Abolins-Krogis, A. (1972) The tubular endoplasmic reticulum in the amoebocytes of the shell-regenerating snail, *Helix pomatia* L. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 128, 58–68.

- Adagbada, A. O, Orok, A. B. and Adesida, S. A. (2011). The Prevalence and Antibiotic Susceptibility Pattern of Entero-pathogens Isolated from Land Snails

# Mass mortality of *Cornu aspersum* in Italian snail farms: an histopathological survey.

Gionata De Vico(1), Andrea Costantino(1), Fabio Marino(2), Tiziana Zottola(3) and Francesca Carella(1)



Dept. of Biology, University of Naples Federico II, 80134 Naples, Italy

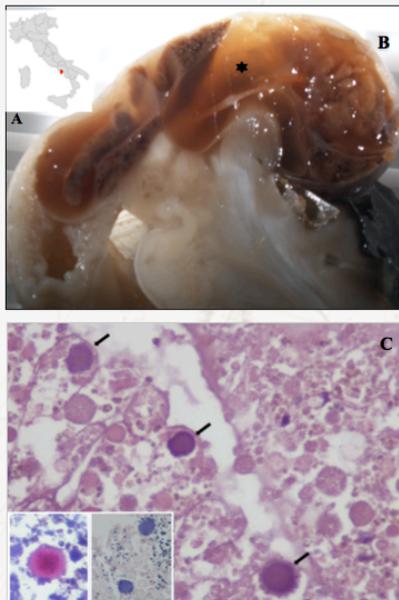
## Introduction

The study of pulmonate gastropods has an ever growing relevance in bio-medical research. *Cornu aspersum* is one of the commercially most important snail species in Europe, also recognized as an emerging vector of Snail Borne Diseases (SBD) affecting both humans and animals worldwide [1]. They are in fact intermediate hosts and vectors of several pathogens for humans and animals, some of which are zoonotic (Giannelli et al., 2015). It is estimated that at least 300 million people living in socially disadvantaged areas, especially in developing countries, suffer from debilitating and often deadly diseases transmitted by these vectors. These include Schistosomiasis, Echinostomiasis, Fascioliasis, Fasciolopsiasis, Paragonimiasis, Opisthorchiasis, Clonorchiasis and Angiostrongylidiasis. Global climate changes, international trade of snails for food and migration of peoples and animals, are changing the geographic patterns and dynamics of certain SBD, due to vectors and associated pathogens redistribution and parasite-host range enlargement (Martens, 1995). Thus, SBD are now emerging also in areas formerly regarded as free, including Europe.

A recent article by Adema et al. (2012), underlines the need for a global effort in basic and applied research to eradicate the SBD in humans and animals. Nowadays, some species of snails are consumed as food by millions of people all over the world (Neofitou and Bozariis, 2014).

*Cornu aspersum* constitute one of the commercially most important snail species in Europe (Neofitou and Bozariis, 2014), and is also recognized as an emerging vector of some SBD worldwide (Giannelli et al., 2015). In this context, basic knowledge of the biology and pathology of these animals is fundamental in order to understand host-parasite interaction, diseases transmission pathways (Giannelli et al., 2015), and to perform both effective farm management and sanitary preventive actions linked to control measures. For that reasons, we performed a histopathological survey on diseases recorded in *Cornu aspersum* in intensive breeding farms. We examined samples from 13 snail farms experiencing mass mortality events (90-100% loss in 2017) from Northern, Central and Southern Italy.

The results obtained, represents the first baseline data in this field in Italy.



**Figure 1:** A, Sampling areas Lombardy, Latium and Sicily (Italy) (red circle); B, Sicily specimens: At gross pathology, *Cornu aspersum* digestive gland were soft, clear, translucent, and sometimes transformed into a gelatinous mass, in which few remaining areas seems to have pale and solid consistency (Fig. 1B, star); C, on histological examination, in degenerating digestive cells basophilic inclusion bodies of significant size are present (arrows), positive to: Feulgen, Giemsa and Macchiavello stains (lower insert).

## Discussion and Conclusions

According to the morphological and staining properties the inclusions in digestive cells of Sicily specimens and those of Calcium Cells of Lombardy specimens were provisionally classified as belonging to Rickettsia-like organisms (RLO). An inflammatory interstitial response accompanied the presence of such RLO in the affected digestive glands. The recording of RLO is of particular concern in terrestrial gastropods: they are emerging pathogens in marine bivalves and in non-pulmonate gastropods (*Haliotis* sp.), associated to mortality events. The RLO, along with the bacterial consortium and the observed protozoan, related with the most relevant lesions recorded, suggest they could have had a pathogenic role in the mass mortality events in the studied snail farms in Italy. To our knowledge this study represent the first baseline record of pathology and diseases observed in snail farms in Italy. The relevance of the data is evident if discussed in comparison to those recorded in other snail farms in Europe [2]. In fact the pathogens observed in our study have not been detected before in similar conditions and could represent emerging diseases in farmed snails. Further studies are necessary to better understand the pathogenic role of the potential pathogens detected and activate control measures.

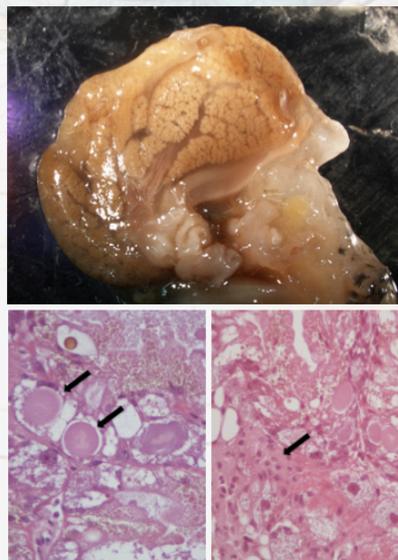
## Materials and Methods

Following a report of mass mortality events we collected a total of 240 specimens of *Cornu aspersum* in 13 snail farms, from Southern (Sicily), central (Latium) and northern (Lombardy) Italy (Fig. 1 A). Once anesthetized, we dissected the snails removing the shells, then fixed the snail tissues in 10% formalin, and processed them for routine histopathology.

For the histological study, slides were stained with following methods: Hematoxylin-Eosin, Fulgen, Macchiavello, Giemsa and Gram. Stains.

## Results

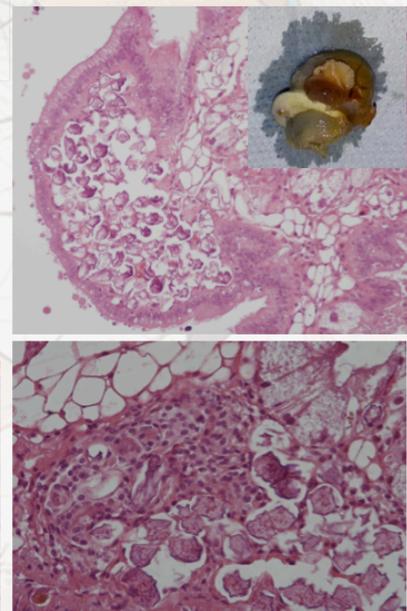
lesions were mainly localized at Kidney and Digestive Gland (DG), and were predominantly characterized by regressive changes (degeneration and necrosis) and massive inflammation (infiltrates, nodules and/or haemocyte capsules), depending on the geographical provenience and examined farm. In most cases the lesions were associated to Rickettsia-Like Organisms (RLO) (70%) and protozoan infections (30%), along with a consortium of both Gram+/- Bacteria. In affected individuals, RLO localized predominantly at DG level. Two morphological types of RLO-associated lesions were observed: in samples from Southern Italy (Sicily) RLO localized in Digestive Cells (DC) only and were associated to regressive changes of DG; on the contrary, in samples from central (Latium) and northern (Lombardy) Italy, RLO localized selectively in Calcium Cells (CC), and were accompanied by infiltrative/nodular inflammation of DG (Figures 1 and 3). Protozoan infection occurred mainly in the Kidney, gut, and DG in Latium samples, with consequent massive infiltrative and nodular/capsular inflammation of the organ (Figure 2).



**Figure 3:** at gross pathology the DG were pale with an edematous interstitium (Fig. 3A). By light microscopy, Calcium Cells (CC) of DG showed eosinophilic inclusions resembling endocellular bacterial colonies of RLO-typ (Fig. 3 B)(Arrows). The presence of such a bacteria was accompanied by moderate to hard interstitial inflammation of DG (Arrows) (Fig. 3 C).



Figure 4: Mass mortality in an Italian Farm



**Figure 2:** At gross examination, some specimens showed lesions at the level of the gastro-enteric apparatus, with dilation and protrusion of intestine (Insert Fig. 2 A). At light microscopy, inflammatory infiltrates, nodules and capsules were observed in all subjects studied at the Gut, the DG, the Lung and the Kidney. The etiology of such lesions is at least partially identifiable in microbial/ protozoan infections (Fig. 2 A and B).

Eaten in Cross-River and Akwa- Ibom States, South-Southern Nigeria. Asian Journal of Pharmaceutical and Health Science, 1: 122 -127.

- Adamo A, Chase R. Courtship and copulation in the terrestrial snail *Helix aspersa*. Can. J. Zool. 1988;66:1446–1453
- Adamowicz A, Bolaczek M. (2003). Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae). Zool Pol;48:93e101
- Adema CM, Bayne CJ, Bridger JM, Knight M, Loker ES, Yoshino TP, et al. (2012) Will All Scientists Working on Snails and the Diseases They Transmit Please Stand Up? PLoS Negl Trop Dis6(12): e1835. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001835>
- Amaral A., Anselmo H., Toste Tristão da Cunha M., Rodrigues A. (2004). The connective tissue index of *Helix aspersa* as a metal biomarker. BioMetals 17, pp: 625– 629.
- Arditi, A., D. Rodríguez, and R. Villar. 2003. Plan de negocios para la cría, procesamiento y comercialización de caracoles *Helix aspersa*. Tesina, Universidad Centro de Estudios Macroeconómicos. Buenos Aires, Argentina. 150 p.
- Bailey S.E.R. (2002) Molluscicidal baits for control of terrestrial gastropods. In: Molluscs as Crop Pests (ed by G.M. Barker) CABI Publishing, New York, pp 33-54
- Baker GH (1991) Production of eggs and young snails by adult *Theba pisana* (Muller) and *Certhuella virgata* (da Costa) (Mollusca: Helicidae) in laboratory cultures and field populations. Australian Journal of Zoology 39, 673–679.
- Baker, G.H., 1986. The biology and control of white snails (Mollusca: Helicidae), introduced pests in Australia. CSIRO, Australia, Division of Entomology Technical Paper 25, pp. 1–31.
- Baker, G.H., Vogelzang, B.K., 1988. Life history, population dynamics and polymorphism of *Theba pisana* (Mollusca: Helicidae) in Australia. J. Appl. Ecol. 25 (3), 867–887.
- Baldwin, E., Bell, D. J.: Preliminary investigations of galactogen from the albumen gland of *Helix pomatia*. J. chem. Soc. 1938, 1461–1465 (1938).
- Barnhart MC. Gas permeability of the epiphragm of a terrestrial snail. *Otala lactea* Physiological Zoology. 1983;56(3):436–44.

- Beeby A.e Richmond L. (2002). Lead reduces shell mass in juvenile garden snails (*Helix aspersa*). *Environmental Pollution* 120, pp: 283-288.
- Benkendorff K. Molluscan Biological and Chemical Diversity: Secondary Metabolites and Medicinal Resources Produced by Marine Molluscs. *Biol. Rev.* 2010, 85, 757–77510.1111/j.1469-185X.2010.00124.x.
- Berger e Dallinger (1997). Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature* vol. 388, 17 luglio, 237.
- Bernard, H.-U., Burk, R.D., deVilliers, E.-M., zur Hausen, H., 2011. Family papillomaviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 235–248.
- BIANNIC M., DAGUZAN J. 1993. Cold-hardiness and freezing in the land snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda; Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.* 104A: 503–506.
- Blinn, W.C. (1964) Water in the mantle cavity of land snails. *Physiological Zoology* 37, 329–337.
- Bloch, D.P. and Hew, H.Y.C. (1960) Schedule of spermatogenesis in the pulmonate snail *Helix aspersa*, with special reference to histone transition. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 7, 515–531.
- Bloch, D.P. and Hew, H.Y.C. (1960) Schedule of spermatogenesis in the pulmonate snail *Helix aspersa*, with special reference to histone transition. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 7, 515–531.
- Bowen, C. E. and H. Tang.; 1996. Conchiolin protein in aragonite shells of mollusks. *Comparative Biochemistry and Physiology* 115A: 269–275.
- Brown, A.C. (1967) Elimination of foreign particles by the snail, *Helix aspersa*. *Nature* 213, 1154–1155.
- Butcher, A.R., Grove, D.I., 2001. Description of the life-cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. *Syst. Parasitol.* 49, 211–221.
- Cameron, R. A. D. and Carter, M. A. 1979. Intra and interspecific effects of population density on growth and activity in some helcid land snails (Gastropoda : Pulmonata). *J. h i m . Ecology*, 48 237-246.

- Champion, M. (1961). The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. Quarterly Journal of Microscopical Science 102, 195–216.
- Capinera JL. 2001. Handbook of Vegetable Pests. Academic Press, San Diego. 729 pp.
- Carella, F., Feist, S.W., Bignell, J.P., De Vico, G., 2015. Comparative pathology in bivalves: aetiological agents and disease processes. J. Invertebr. Pathol. 131, 107–120.
- Charrier M, Fonty G, Gaillard-Martine B, Ainouche K, Andant G. 2006. Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda:Pulmonata). Biol. Res., 39: 669-681.
- Chase, R. (1986a)- Brain cells that command sexual behavior in the snail *Helix aspersa*. Journal of Neurobiology 17, 669–679.
- Chase, R. (1986b). Lessons from snail tentacles. Chemical Senses 11, 411–426.
- Chase, R. (2000) Structure and function in the cerebral ganglion. Microscopy Research and Technique 49, 511–520.
- Ronald Chase and Katrina C. Blanchard, “The Snail's Love Dart Delivers Mucus to Increase Paternity,” Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences 273, no. 1593 ( 2006): 1471–75.
- Chase, R. and Vaga, K. (2006). Independence, not conflict, characterizes dart shooting and sperm exchange in a hermaphroditic snail. Behav. Ecol. Sociobiol. (doi:10.1007/s00265-005-0103-y)
- Chase, R. and Kamil, R. (1983) Morphology and odor sensitivity of regenerated snail tentacles. Journal of Neurobiology 14, 43–50.
- Chase, R. and Rieling, J. (1986) Autoradiographic evidence for receptor cell renewal in the olfactory epithelium of a snail. Brain Research 384, 232–239.
- Chase, R. and Tolloczko, B. (1985) Secretory glands of the snail tentacle and their relation to the olfactory organ. Zoomorphology 105, 60–67.
- Chase, R. and Tolloczko, B. (1986) Synaptic glomeruli in the olfactory system of a snail. Cell and Tissue Research 246, 567–573.
- Chase, R. and Tolloczko, B. (1993) Tracing neural pathways in snail olfaction: from the tip of the tentacle to the brain and beyond. Microscopy Research and Technique 24, 214–230.

- Chase, R. and Tolloczko, B. (1993). Tracing neural pathways in snail olfaction: from the tip of the tentacle to the brain and beyond. *Microscopy Research and Technique* 24, 214–230.
- Cœurdassier M., Gomot-de Vaufleury A., Lovy C. (2002). Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, pp: 425-431.
- Courty J.M. & Kierlik E.; 2009. Avancer comme un escargot. *Pour la Science*, n°378 : 94-96.
- Daguzan J. (1989). Snail rearing or heliciculture of *Helix aspersa* Müller. In *Slugs and Snails in World Agriculture*, British Crop Protection Council Monograph 41 (ed. Henderson I. F.), pp. 3–10. Thornton Heath, UK
- Dallinger, R. (1993). Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow, P.S.(eds), *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis, Boca Raton, FL, pp.: 245-289.
- De Vico, G., Carella, F., 2012. Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Res. Vet. Sci.* 93, 1109–1115.
- Dimitriadis, V.K., 2001. The digestive system of Stylommatophora. In: Barker, G.M. (Ed.), *The Biology of Terrestrial Molluscs*. CAB Intern., pp. 237–257.
- Dittbrenner, N., Lazzara, R., Köhler, H.R., Mazzia, C., Capowiez, Y., Triebkorn, R., 2009. Heat tolerance in Mediterranean land snails: histopathology after exposure to different temperature regimes. *J. Mollus. Stud.* 75, 9–18.
- Drozdowski, A., Bikowska, E., 1994: Wpływ pasożytniczych larw przywr na aktywność immunologiczną limaków. *Prz. Zool.* 38: 1-2: 19-23.
- Duncan, C., J., 1958. - The anatomy and physiology of the reproductive system of the freshwater snail *Physa fontinalis* (L.)., *Proceedings of the Zoological Society of London* 131(1):55-84.
- Elston, R., 1997. Special topic review: Bivalve mollusc viruses. *World J. Microb. Biotechnol.* 13, 393–403.
- Elvitigala, D.A., Premachandra, H.K.A., Whang, I., Nam, B.-H., Lee, J., 2013. Molecular insights of the first gastropod TLR counterpart from disk abalone (*Haliotis discus discus*), revealing its transcriptional modulation under pathogenic stress. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 334–342.

- Emery, D.G. (1992) Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs. *Microscopy Research and Technique* 22, 307–324.
- Emslie, F.R., 2005, 'A field evaluation of three trypanosomosis control strategies, in Kwazulu-Natal, South Africa', MSc thesis, Department of Production Animal Studies, University of Pretoria.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Forte A. , A. Zucaro , G. De Vico, A. Fierro. Carbon footprint of heliculture: A case study from an Italian experimental farm ; *Agricultural Systems* 142 (2016) 99–111
- Fournié, J. and Chétail, M. (1984). Calcium dynamics in land gastropods. *American Zoologist* 24, 857–870.
- Fryer, S.E., Bayne, C.J., (1996). Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain - specific manner by adsorbed plasma components. *Dev. Comp. Immunol.* 20(1): 23-37.
- Garcia, C., Robert, M., Arzul, I., Chollet, B., Joly, J.P., Miossec, L., Comtet, T., Berthe, F., 2006. Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France: from occasional records to disease emergence? *Dis. Aquat. Organ.* 70, 193–199.
- Giannelli, A. et al. (2015) Release of lungworm larvae from snails in the environment: potential for alternative transmission pathways. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003722
- Glinski, Z., Jarosz, J., 1997: Układ immunologiczny mięczaków. In: *Zjawiska odpornoci przeciwzakanej u bezkrêgowców*. Wyd. UMC., Lublin, 90-100.
- Gomot A. (1997). Dose-Dependent Effects of Cadmium on the Growth of Snails in Toxicity Bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33, pp: 209-216.
- Górka A, Oklejewicz B, Duda M (2017) Nutrient Content and Antioxidant Properties of Eggs of the Land Snail *Helix aspersa maxima*. *J Nutr Food Sci* 7: 594. doi: 10.4172/2155-9600.1000594
- Grewal, P.S., Grewal, S.K., Tan, L., Adams, B.J., 2003. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. *J. Nematol.* 35, 146–156.

- Harris, K.R., Cheng, T.C., 1975: The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongyloid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. *Int. J. Parasitol.* 5: 521-528.
- Haszprunar G. (1996). The molluscan rhogocyte (pore cell, blasenzelle, cellule nucale) and its significance for ideas on nephridial evolution. *J Mollusc Stud.*; 62: 185–211.
- Henderson I. & Triebkorn R. (2002) Chemical control of terrestrial gastropods. In: *Molluscs as Crop Pests* (ed by G.M. Barker) CABI Publishing, New York, pp 1-32
- Heusser S., Dupuy H.G.; De la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les Gastéropodes Pulmonés (I). *Éléments d'histologie et de physiologie des espèces Helix aspersa et Helix pomatia*; *Folia conchyliologica*, n°10, Avril 2011.
- Heusser S..et Dupuy H.-G. De la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les Gastéropodes Pulmonés (I) *Éléments d'histologie et de physiologie des espèces Helix aspersa et Helix pomatia*, *Folia conchyliologica*, n°10, Avril 2011
- Howard, B., Mitcel, P.C.M., Ritchie, A., Simkiss, K. and Taylor, M.G. (1981) The composition of intracellular granules from the metal accumulating cells of the common garden snail (*Helix aspersa*). *Biochemical Journal* 194, 307–511
- Howard, D.H., Lewis, J.L., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. NOAA Tech. Memorandum NOS NCCOS 5, 218.
- <http://www.istitutodielicoltura.it/it/>
- Deyrup-Olsen I., D. L. Luchtel, A. W. Martin 1983. Components of mucus of terrestrial slugs (Gastropoda). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Sep 1983, 245 (3) R448-R452;
- Iglesias J., Castillejo J., Field observations on the land snail *Helix aspersa* Müller, *J. Molluscan Stud.* 65 (1999) 411–423.
- J. Daguzan, J.C. Bonnet, Yvette Perrin, E. Perrin, H. Rouet. Contribution à l'élevage de l'escargot Petit-gris : *Helix aspersa* Muller (Mollusque gasteropode pulmone stylommatophore). II. - Evolution de la population juvenile de l'eclosion à l'âge de 12 semaines, en batiment et en conditions d'elevage controlees. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences*, 1982, 31 (2), pp.87-110.

- Johnson, M.S., 1988. Founder effects and geographic variation in the land snail *Theba pisana*. *Heredity* 61, 133–142.
- Jones, H.D. (1973). The mechanism of locomotion of *Agriolimax reticulatus* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Zoology* 171, 489–498.
- Jones, H.D., Fretter, V. and Peake, J. (1975). *Locomotion in Pulmonates*. Academic Press, New York, pp. 1–32.
- Kelly, D.C., 1981. Baculovirus replication: electron microscopy of the sequence of infection of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus in *Spodoptera*. *J. Gen. Virol.* 52, 209–219.
- Kiebre-Toe M. B., Borges E., Maurin F., Richard Y. and Kodjo A. (2003). Etude de la flore bactérienne aérobie à Gram négatif de l'escargot d'élevage (*Helix aspersa*). *Revue de Médecine Vétérinaire* 154, 605–610
- Kiebre-Toe MB, Lancheretz A, Villard L, Richard Y, Kodjo A. 2005. Pulsedfield gel electrophoresis profiles of aeromonads isolated from healthy and diseased *Helix aspersa* from French snail farms. *Can J Microbiol* 51: 817-820.
- Koleva et al. *J. BioSci. Biotechnol.* 2015, 4(3): 263-269.
- Kramarz PE, Vaufleury A, Zygmunt PMS, Verdun C (2007) Increased response to cadmium and *Bacillus thuringiensis* maize toxicity in the snail *Helix aspersa* infected by the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Environ Toxicol Chem* 26(1):73–79
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Laskowski et al.,(1996). Accumulation of Zn,Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): implication for predators. *Environmetal Pollution*, vol. 91,n.3, pp: 289-297.
- Lawrence A. Lacey-Field *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology\_ Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests (2007).pdf*
- Le Deuff, R.-M., Renault, T., 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* followed by sequencing of viral genome. *J. Gen. Virol.* 80, 1317–1322.

- Ledergerber S, Leadley PW, Stocklin J, Baur B. 1998. Feeding behaviour of juvenile snails (*Helix pomatia*) to four plant species grown at elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Acta Oecologica*. 19:89-95.
- Lemaire M. e Chase R. (1998). Twitching and quivering of the tentacles during snail olfactory orientation. *J Comp Physiol A* 182, pp: 81-87.
- Lesel M, Charrier M, Lesel R. 1990. Some characteristics of the bacterial flora housed by the brown garden snail *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata). Preliminary results. In: Lesel R (ed) *Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotheims*. Amsterdam: Elsevier Sciences, 149-152.
- Li, G. and Chase, R. (1995). Correlation of axon projections and peptide immuno- reactivity in mesocerebral neurons of the snail *Helix aspersa*. *Journal of Comparative Neurology* 353, 9–17.
- Loker, E.S., 2010. *Gastropods immunobiology*. In: In: Söderhäll, K. (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology – Invertebrate Immunity*, vol. 708. Springer, US, pp. 17–43.
- Magnius, L., Norder, H., 2011. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 444–455.
- Major R., E.O., Pipas, J.M., Ramqvist, T., 2011. In: King, A.M.Q., Adams, J.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 279–290.
- Martens, W. J. M.: 1995, *Modelling the Effect of Global Warming on the Prevalence of Schistosomiasis*, RIVM Report No. 461502010.
- Martin, A.W., Stewart, D.M. and Harrison, F.M. (1965) Urine formation in the pulmonate land snail, *Achatina fulica*. *Journal of Experimental Biology* 42,
- Mason, W.S., Gerlich, W.H., Taylor, J.M., Kann, M., Mizokami, T., Loeb, D., Sureau, C.,
- Massobrio et al.: Selective modulation of chemical and electrical synapses of *Helix* neuronal networks during in vitro development. *BMC Neuroscience* 2013 14:22.

- Matricón-Gondren, M., Letocart, M., (1999). Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. *J. Inv. Path.* 73(3): 235-247.
- Mayers, T.R., Burto, T., Evans, W., Starkey, N., 2009. Detection of viruses and virus-like particles in four species of wild and farmed bivalve molluscs in Alaska, USA, from 1987 to 2009. *Dis. Aquat. Organ.* 88, 1–12.
- McCarragher, G. and Chase, R. (1985) Quantification of ultrastructural symmetry at molluscan chemical synapses. *Journal of Neurobiology* 16, 69–74.
- Ministerio De Medio Ambiente Y Medio Rural Y Marino. Ganadería. Sector Helicícola. Indicadores económicos. Retrieved 9 August 2008, from [http://www.mapa.es/es/ganaderia/pags/sector\\_helicicola/indicadores\\_economicos.htm](http://www.mapa.es/es/ganaderia/pags/sector_helicicola/indicadores_economicos.htm). Accessed on 9 August, 2008.
- Nagamine, T., Abe, A., Suzuki, T., Dohmae, N., Matsumoto, S., 2011. Co-expression of four baculovirus proteins, IE1, LEF3, P143, and PP31, elicits a cellular chromatin- containing reticulate structure in the nuclei of uninfected cells. *Virology* 417, 188–195.
- Norkin, L.C., Allander, T., Atwood, W.J., Buck, C.B., Garcea, R.L., Imperiale, M.J., Johne, Odendaal, L.J., Haupt, T.M., Charles, L., 2008. The alien invasive land snail *Theba pisana* in the West Coast National Park: Is there cause for concern? *Koedoe* 50, 93–98.
- Renault, T., 2011. Virus affecting marine molluscs. In: In: Hurst, C.J. (Ed.), *Studies in virale ecology: Animal Host Systems*, vol. 2. John Wiley & Sons Inc, First Edition, pp. 153–175 (Chapter 6).
- Oosterhoff L.M., 1977. Variation in growth rate as an ecological factor in the land snail *Cepaea nemoralis*. *L. Neth. J. Zool.*, 27, 1-132.
- Paperna A., I., Markovics, A., 1996. The influence of aestivation in land snails on the larval development of *Muellerius capillaris* (Metastrongylidae: Protostrongylidae). *Int. J. Parasitol.* 26, 363–367.
- Parlapani, F. F., Neofitou, C. and Boziaris, I. S. (2014). Microbiological quality of raw and processed wild and cultured edible snails. *J. Sci. Food Agric.*, 94: 768–772. doi:10.1002/jsfa.6438
- Pavat C., et al. (2012); *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 161 303–314

- Pawlicki, J. M., Pease, L. B., Pierce, C. M., Startz, T. P., Zhang, Y. and Smith, A. M. (2004). The effect of molluscan glue proteins on gel mechanics. *J. Exp. Biol.* 207, 1127-1135.
- Riddle, W.A. (1983). Physiological ecology of land snails and slugs. In: Russell-Hunter, W.D. (ed.) *The Mollusca*, Vol. 6, Ecology. Academic Press, London, pp. 431–461
- Ruiz, M., Darriba, S., Rodríguez, R., Iglesias, D., Lee, R., López, C., 2011. Viral basophilic inclusions in the digestive gland of razor clams *Ensis arcuatus* (Pharidae) in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.* 94, 239–241.
- Salánki, J. and van Bay, T. (1976). Peripheral and central discrimination of chemoreceptor stimulation in the snail, *Helix pomatia* L. In: Salánki, J. (ed.) *Neurobiology of Invertebrates. Gastropoda Brain*. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 497–510.
- Sallam, A., El-Wakeil, N., 2012. Biological and ecological studies on land snails and their control. In: Soloneski, S. (Ed.), *Integrated Pest Management and Pest Control – Current and Future Tactics*. InTech, pp. 413–444 ISBN: 978-953-51-0050-8. Salmon,
- Segade P, Crespo C, Garcia N, Garcia-Estévez JM, Arias C, Iglesias R. *Brachylaima aspersae* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) infecting farmed snails in NW Spain: morphology, life cycle, pathology, and implications for heliciculture. *Vet Parasitol.* 2011;175:273–286.
- Serrano T. et al., (1996); Light and electron microscopy study of the salivary gland secretory cells of Helicoidea (Gastropoda, Stylommatophora).
- Sminia, T., 1981: Gastropods. In: *Invertebrate Blood Cells*. RATCLIFFE N.A. and ROWLEY A.F. (eds.) Academic Press, London-New York, Vol. 2: 191-232.
- Sminia, T., Borghart-Reiders, E., Van De Linde, A.W., (1974) : Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. An electron microscopic and autoradiographic study. *Cell. Tiss. Res.* 153: 307.
- Smith, L.H. (1981). Quantified aspects of pallial fluid and its affects on the duration of locomotor activity in the terrestrial gastropod *Triodopsis albolabris*. *Physiological Zoology* 54, 407–414.

- Sommerville B.A., 1973: The circulatory physiology of *Helix pomatia*. II. The isolated heart. *J. exp. Biol.* 59, 283–289
- South, A. 1992. *Terrestrial Slugs: Biology, Ecology and Control*. Chapman and Hall, London.
- Steinbach, P. (1977). Granular cells in the connective tissue of *Helix*. *Cell and Tissue Research* 181, 91–103.
- Szkucik K., Ziomek M, Mackowiak-Dryka M, Paszkiewicz W (2011). Edible - use, nutritional value and safety for the health of the consumer. *Zycie Wet* 86: 631-635.
- Tamura K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687.
- Taylor, G.M., Simkiss, K., Greaves G.N. and Harries, J. (1988). Corrosion of intracellular granules and cell death. *Proceedings of the Royal Society of London* 234, 436–476.
- Tripp, M.R., 1970: Defense mechanisms of Mollusks. *Res. J. Ret. Soc.* 7: 173-182.
- Vorwohl, G. (1961). Zur Funktion der Exkretionsorgane von *Helix pomatia* (L.) und *Archachatina ventriososa* (Gould). *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 45, 12–49.
- Wagge, L.E. (1955). Amoebocytes. *International Review of Cytology* 4, 31–78.
- Wondrak, G. (1969a). Die Ultrastruktur der Zellen aus dem interstitiellen Bindegewebe von *Arion rufus* (L.), Pulmonata, Gastropoda. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 95, 249–262.
- Yasoshima M., Matsuo M., Kuno A., Takano A. (2001). Studies on intake of heavy metals by *Bradybaena similaris*, land snails, by XAFS measurement. *J. Synchrotron Rad* 8, pp: 969-971
- Young, J.C., MacKinnon, E.A., Faulkner, P., 1993. The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells in vitro infected by *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *J. Struct. Biol.* 110, 141–143.
- Yozwiak, N.L., Skewes-Cox, P., Stenglein, M.D., Balmaseda, A., Harris, E., et al., 2012. Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep

sequencing. PLoS Negl. Trop. Dis. 6 (2), e1485. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001485>.

- Tonar Z., A. Markoš; (2004). Microscopy and morphometry of integument of the foot of pulmonate gastropods *Arion rufus* and *Helix pomatia* Acta Veterinaria Brno, 73, pp. 3-8.
- Vieites C.M., O.M. González, and C. Acuña Seery. 2007. Producciones Animales Alternativas con Potencial de Desarrollo Mediato e Inmediato en la Argentina. Estudio 1.EE.152. Unidad de Prein- versión (UNPRE). Banco Interamericano de Desarrollo. Editorial Fundación I+I. Buenos Aires, Argentina. 185 pp.
- Zhao, M., Wang, T., Adamson, K.J., Storey, K.B., Cummins, S.F., 2016. Multi-tissue transcriptomics for construction of a comprehensive gene resource for the terrestrial snail *Theba pisana*. Sci. Rep. 6, 20685. <http://dx.doi.org/10.1038/srep20685>.