



Protocolo de infección de molly (*Poecilia latipinna*) con larvas de *Anisakis pegreffii*:

Obtención del parásito: Las larvas 3 (tercer estado larval) de *Anisakis pegreffii* se extraen manualmente de vísceras de bacaladilla (*Micromesistius poutassou*). Si es necesario (está encapsulado), se ha de sacar al parásito de la capsula cuidadosamente con agujas entomológicas. Las larvas se mantienen en solución salina (salinidad 9‰) hasta su uso en la experiencia. Todas las larvas han de ser examinadas previamente bajo la lupa binocular para encontrar posibles daños o alteraciones en la cutícula del parásito (producidas antes o durante la manipulación): solo aquellas larvas con la cutícula aparentemente intacta y con alta vitalidad han de ser usadas en el ensayo.

Obtención de mollies libres de parásitos: los individuos de molly (*P. latipinna*) variedad “plata” son comprados de distribuidores de acuariofilia (7.2 – 8.9 g; 4.4 – 5.9 cm en este experimento). Los peces llegan en agua dulce y deben ser aclimatados a agua de mar con salinidad 37‰ siguiendo el método de Yoshinaga y Dickerson (1994) en acuarios de 15 L con aireación constante, filtros de carbono y una temperatura entre 25 – 27°C (en este caso, en las instalaciones del SCSIE (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia).

Anestesia: los peces han de ser anestesiados con MS222 (metanosulfonato de tricaina, 0.03% tamponado en agua de mar, Sigma-Aldrich), para su posterior recuperación.

Infección experimental; infección oral: los peces se mantienen en ayuno 72 h antes de la experiencia. Se distribuyen individualmente en recipientes de 1 L con agua de mar (salinidad 37‰) a una temperatura entre 25 – 27°C y se dejan aclimatar por 24 h en estos nuevos recipientes. Una vez pasado el nuevo periodo de aclimatación al recipiente de 1 L, se le ofrecen como alimento una dosis fija de larvas 3 de *A. pegreffii* a cada pez. Los peces serán transferidos al acuario de mantenimiento una vez hayan comido de manera natural las larvas, o 9 h después de haber sido ofrecido el parásito (incluso si algunas larvas no fueron ingeridas).

Infección experimental; infección orogástrica: después de la anestesia, se introduce una dosis fija de larvas 3 de *A. pegreffii* en el esófago cada pez con unas pinzas oftalmológica, de aluminio y maleables para después empujar los anisakis con una pipeta Pasteur con la punta de vidrio fundida (para evitar heridas en el pez). Una vez infectados, los molly se recuperan de la anestesia en un tanque con agua de mar y oxigenación constante antes de ser devueltos al acuario.