



Protocolo de infección de dorada (*Sparus aurata*) con *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 doradas libres de parásito: los juveniles SPF (“specific-pathogen-free”) de dorada (*S. aurata*) son proporcionadas por instalaciones de cría y mantenidas en tanques con agua de mar (salinidad 37 ‰) a 21-22 °C y alimentadas con pienso extruido para doradas. Conviene utilizar doradas de pequeño tamaño, para facilitar el manejo (en el caso de este proyecto, con un rango de peso de unos 25-40g).

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: después de la anestesia, se introduce una dosis fija de larvas 3 de *A. pegreffii* en el estómago cada dorada mediante una jeringa de insulina de plástico de 0,4 cm de ancho con la punta roma (suavizada con una lima). La dosis fija (10 larvas en el presente estudio) se mezcla en la jeringa con una pasta húmeda preparada con el propio alimento de las doradas y solución salina. Una vez infectadas, las doradas se recuperan de la anestesia en un tanque de 25 L con agua de mar y oxigenación constante antes de ser devueltas al tanque.

Infection protocol:

Parasite: *Anisakis simplex* s.s. third stage larvae manually extracted from viscera of blue whiting (*Micromesistius poutassou*). If needed, remove capsules carefully with fine needles. Larvae are kept in saline solution, prior to the assay, all larvae must be carefully examined under a stereomicroscope for any damage or alteration of the cuticle and only unharmed and apparently healthy larvae are used.

Gilthead seabream: Juvenile specific-pathogen-free (SPF) gilthead seabream (*Sparus aurata*) (27-42 g) supplied by a hatchery from Burriana (Castellón, Spain), and maintained in 3000 L tanks in sea water (37 ‰) at 21 - 22 °C for acclimatation and fed with dried pelleted food.

Anaesthesia: Fish are anesthetized with MS222 (tricaine methanesulfonate, 0.03% solution buffered in seawater; Sigma- Aldrich).

Experimental infection: Following the anaesthesia a fixed dose of 10 *Anisakis simplex* s.s. larvae are given to each gilthead seabreams using a 0.4 cm wide plastic blunt tip syringe to reach their digestive tract. The fix dose of larvae is mixed, with a pâte-like paste prepared with feed and physiological saline solution. Gilthead seabreams are allowed to recover from anaesthesia in a 25 L tank with clean oxygenated seawater and then returned to the 3000 L tanks.