

Prevalencia de infestación por garrapatas y probabilidad de infección por malaria aviar en aves simpátricas esteparias en España

Daniel Bustillo-de la Rosa^{1,2} , Marta Sánchez-Sánchez³ , Isabel G. Fernández-De-Mera³ , Úrsula Höfle³ , Adrián Barrero^{1,2} , Julia Gómez-Catasús^{1,2} , Margarita Reverter^{1,2} , Julia Zurdo^{1,2} , Cristian Pérez-Granados⁴ , Manuel B. Morales^{1,2} , Juan Traba^{1,2,*} 

- (1) Terrestrial Ecology Group (TEG-UAM), Departamento de Ecología, Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, Spain
- (2) Centro de Investigación en Biodiversidad y Cambio Global (CIBC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, Spain
- (3) SaBio Research Group. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC, CSIC-UCLM-JCCM), Ronda de Toledo 12, 13005, Ciudad Real, Spain
- (4) Biodiversity Management and Conservation Programme, Forest Science and Technology Center of Catalonia (CTFC), 25280 Lleida, Spain

* Autor para correspondencia / Corresponding author: Juan Traba [juan.traba@uam.es]

> Recibido / Received: 10/10/2024 – Aceptado / Accepted: 21/01/2025

Cómo citar / How to cite: Bustillo-de la Rosa, D., Sánchez-Sánchez, M., G. Fernández-de-Mera, I., Höfle, Úrsula, Barrero, A., Gómez-Catasús, J., Reverter, M., Zurdo, J., Pérez-Granados, C., Morales, M.B., Traba, J. 2025. Prevalencia de infestación por garrapatas y probabilidad de infección por malaria aviar en aves simpátricas esteparias en España. *Ecosistemas* 34(2): 2891. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2891>

Prevalencia de infestación por garrapatas y probabilidad de infección por malaria aviar en aves simpátricas esteparias en España

Resumen: En el presente estudio se investiga la presencia, identidad y prevalencia de infestación de garrapatas en distintas especies de aves esteparias en el centro de España, además del potencial papel que puede tener el pastoreo sobre ello. Además, se determina, a través de técnicas moleculares, la presencia de patógenos transmitidos por garrapatas en las distintas especies de aves y la presencia de malaria aviar en garrapatas. Por otro lado, se analiza la variación de prevalencia, tanto de infestación por garrapatas, como de malaria aviar, en función de la especie de ave y de la carga ganadera presente en la zona de estudio. La prevalencia de infestación por garrapatas varió entre el 1.7% en la collalba rubia (*Oenanthe hispanica*) y el 46.3% en la alondra ricotí (*Chersophilus duponti*), siendo significativamente más alta en la alondra ricotí. La presencia de garrapatas con malaria aviar se detectó en dos de las especies analizadas. El porcentaje de garrapatas en las que se detectó presencia de malaria aviar fue del 100% en el caso de la collalba rubia (dos garrapatas analizadas), y del 21.6% en el caso de la alondra ricotí (de las 409 garrapatas analizadas). La presencia de garrapatas y la prevalencia de malaria no se relacionaron significativamente con la intensidad de uso ganadero. Nuestros resultados proporcionan información nueva y relevante sobre la probabilidad de infestación por garrapatas en aves esteparias y su potencial papel como vector de enfermedades infecciosas.

Palabras clave: Alondra ricotí; ganado; garrapatas; Plasmodium; patógenos; vectores

Prevalence of infestation by ticks and probability of infection by avian malaria in sympatric steppe birds in Spain

Abstract: This study investigates the presence, identity and infestation prevalence of ticks in different steppe bird species in central Spain, as well as the potential influence of anthropogenic practices, such as grazing, in this regard. In addition, the presence of vector-borne pathogens and the presence of avian malaria in ticks of different bird species is determined using molecular techniques. On the other hand, the variation in prevalence of both ticks and avian malaria is analyzed according to the species of birds and the livestock density in the study area. The prevalence of tick infestation ranged from 1.7% in the Western Black-eared Wheatear (*Oenanthe hispanica*) to 46.3% in the Dupont's Lark (*Chersophilus duponti*), being significantly higher in the Dupont's Lark. The presence of ticks with avian malaria was found in two of the species analyzed. The percentage of ticks in which avian malaria was detected was 100% for Western Black-eared Wheatear (two ticks analyzed) and 21.6% for the Dupont's Lark (of the 409 ticks analyzed). The presence of ticks and prevalence of avian malaria was not significantly related to the intensity of livestock density. Our results provide new and relevant information on the probability of tick infestation in steppe birds and their potential role as a vector of infectious diseases.

Keywords: Dupont's lark; Livestock; pathogens; Plasmodium; ticks; vectors

Introducción

Las garrapatas y los parásitos de la malaria aviar son ectoparásitos y endoparásitos respectivamente, que pueden tener importantes efectos en la salud, comportamiento, supervivencia y éxito reproductor de las aves (Marzal et al. 2005; Heylen y Matthysen 2008; Bustillo-de la Rosa et al. 2022). Las garrapatas se encuentran entre los ectoparásitos más generalizados que

afectan a las aves, causándoles daños físicos directos y generando consecuencias directas como anemia, irritación de la piel y una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias, lo que en conjunto puede conducir a un menor éxito reproductor y supervivencia (Merino y Møller 2010). Además, las garrapatas pueden actuar como vectores de diversos patógenos, como bacterias (e.g., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*), virus (e.g., el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas) y protozoos (e.g., *Babesia* spp., *Theileria* spp.) (Palomar et al. 2012; Sparagano et al. 2015), siendo alguno de estos patógenos zoonóticos (Ogden et al. 2008). Asimismo, el patrón de distribución de las garrapatas se está expandiendo (Simon et al. 2014; Ogden et al. 2021), por lo que las garrapatas suponen una amenaza potencial tanto para la fauna silvestre, como para la salud humana. Investigaciones previas han demostrado que la prevalencia de garrapatas en las poblaciones de aves varía ampliamente en función de las condiciones ambientales y las características del hospedador (Loss et al. 2016; Brinkerhoff et al. 2019). Por ejemplo, ciertas especies de aves son más propensas a las infestaciones por garrapatas debido a factores como la selección del lugar de nidificación, el comportamiento de búsqueda de alimento y el tipo de hábitat (Ghosh et al. 2006; Keve et al. 2022). Además, se ha demostrado que la infestación por garrapatas y malaria puede variar en función del ciclo vital de la especie de ave (por ejemplo, migratoria o residente) (Waldenström et al. 2002; Ogden et al. 2008). Por lo tanto, la investigación sobre la identificación, prevalencia y distribución de las infestaciones por garrapatas en aves, así como la posible detección de malaria aviar presente en garrapatas, es crucial para comprender el estado de salud y de conservación de las poblaciones de aves (Norte et al. 2013), la epidemiología de las enfermedades transmitidas por vectores, identificar las zonas de alto riesgo y aplicar estrategias de gestión eficaces (Estrada-Peña et al. 2013).

La malaria aviar, causada por parásitos protozoarios de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* (orden Haemosporida), es una preocupación importante para el estado de salud de las poblaciones de aves (Valkiūnas 2005). Estos parásitos son transmitidos por insectos hematófagos (orden Diptera), como mosquitos (Atkinson 2008) principalmente de la familia Culicidae (Santiago-Alarcon et al. 2012; Valkiūnas e Iezhova 2018) o moscas (familias Hippoboscidae y Ceratopogonidae) (Santiago-Alarcon et al. 2012). La malaria aviar provoca una serie de efectos patológicos que van desde signos clínicos discretos o leves hasta una morbilidad grave y mortalidad (Valkiūnas 2005). Se ha determinado que la prevalencia de la malaria aviar en las poblaciones de aves alcanza casi el 20% en todo el mundo (Yan et al. 2024) y está influida por el clima, el hábitat, la abundancia de vectores y la susceptibilidad específica de las especies de aves (Bensch et al. 2009; LaPointe et al. 2012). Estudiar la posible presencia de malaria aviar ayuda a comprender la dinámica de la enfermedad y a desarrollar estrategias para mitigar su impacto en las poblaciones de aves susceptibles a la misma (Atkinson y LaPointe 2009). Este conocimiento no sólo es fundamental para la conservación de las aves, sino también para comprender procesos ecológicos más amplios y la interconexión de las especies dentro de sus hábitats.

El cambio climático y las alteraciones del medio ambiente a lo largo del tiempo han sido identificadas como causas clave de la expansión de parásitos debido, entre otras cosas, a la variación fenológica no sólo de los parásitos (es decir, vectores como garrapatas y mosquitos, o patógenos transmitidos por ellos), sino también de sus hospedadores (Merino y Møller 2010). Por tanto, es de gran importancia considerar el papel de los hospedadores potenciales (como por ejemplo ungulados u otras especies asociadas al ganado doméstico) en la infestación por garrapatas. No obstante, la interacción entre el ganado doméstico y la fauna silvestre es un área de investigación ecológica compleja. Un aspecto significativo de esta interacción es la influencia de los rebaños de ovejas en la probabilidad de infestaciones parasitarias, actuando, por ejemplo, como reservorios de garrapatas (Springer et al. 2020; Defaye et al. 2022). Se sabe que las ovejas albergan diversas especies de garrapatas, lo que, combinado con sus patrones de movimiento y pastoreo, puede contribuir a la dispersión de las garrapatas por distintos hábitats (Estrada-Peña et al. 2013) y, por tanto, a la infestación de aves y otros animales silvestres (Ogden et al. 2008). Esto puede ocasionar una mayor prevalencia de enfermedades transmitidas por garrapatas en las poblaciones de aves de zonas con mayor presencia de ganado, afectando a su salud y estado físico (Heylen y Matthysen 2008). Además, los rebaños de ovejas pueden llegar a influir en infecciones de la fauna silvestre, como la malaria aviar, actuando como atrayentes de insectos vectores, por ejemplo, por la presencia de puntos de agua para el ganado, los cuales pueden actuar como reservorio de mosquitos (González-Quevedo et al. 2014; Ferraguti et al. 2018). El pastoreo de ovejas puede provocar también una reducción de la cubierta vegetal, la compactación del suelo y la modificación de las especies vegetales, dependiendo de la intensidad del pastoreo (Centeri 2022). Ferraguti et al. (2018) demostraron cómo la cercanía de cuerpos de agua, riqueza de especies de vertebrados, dinámicas poblacionales e insectos vectores, como los mosquitos, y la composición y estructura del hábitat, pueden repercutir en la dinámica de transmisión de la malaria aviar y otros patógenos. Por lo tanto, comprender la posible influencia del ganado en la infestación parasitaria de las aves es crucial para proporcionar medidas específicas para la conservación de la fauna silvestre y la gestión ganadera. Sin embargo, nuestros conocimientos actuales sobre la relación entre pastoreo por rebaños de ovejas y la infestación parasitaria de las aves son bastante limitados.

En este estudio, mediante la integración de muestreos de campo, diagnósticos moleculares y análisis ecológicos, pretendemos mejorar nuestra comprensión sobre infecciones parasitarias en aves esteparias, la variación de la prevalencia de dichas infecciones entre especies simpátricas y si presentan alguna asociación con la intensidad de pastoreo por ganado doméstico. Una mejor comprensión de la probabilidad de presencia de garrapatas y de potencial infección por malaria aviar en aves esteparias, junto con los factores que influyen en estos riesgos, puede contribuir al conocimiento de la salud aviar y a la conservación de la biodiversidad en los ecosistemas esteparios, globalmente amenazados. En concreto, los objetivos de este estudio fueron: (1) identificar las especies de garrapatas y patógenos presentes en estas en seis especies simpátricas de passeriformes esteparios; (2) determinar la prevalencia de infestación por garrapatas y probabilidad de infección por malaria aviar en este grupo de aves; y (3) evaluar la posible influencia del pastoreo por rebaños de ovejas en la prevalencia de garrapatas y malaria en las especies estudiadas. Examinamos la potencial variación en la prevalencia de garrapatas entre las especies estudiadas, y predecimos una mayor prevalencia de garrapatas e infección por malaria aviar en zonas con mayor presencia de rebaños ovinos.

Metodología

Área de estudio y procedimiento de muestreo

Este estudio se llevó a cabo entre los años 2017 y 2021, en las Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA) de Altos de Barahona y Páramo de Layna (provincia de Soria, centro de España, [Fig. 1](#)). Se trata de extensiones llanas de estepa natural a gran altitud (1100–1200 msnm), dominadas por arbustos basófilos continentales ([Zurdo et al. 2021](#)) con presencia de cultivos y árboles dispersos. El clima es mediterráneo continental ([Aranbarri et al. 2015](#)). En estas zonas la actividad de pastoreo por rebaños ovinos ha estado históricamente presente y continúa siendo una actividad relevante ([Gómez-Catasús et al. 2023](#)).

Este estudio se centra en seis passeriformes esteparios simpátricos durante la época de cría ([Barrero et al. 2023a; 2024](#)): alondra ricotí (*Chersophilus duponti*), alondra común (*Alauda arvensis*), terrera común (*Calandrella brachydactyla*), collalba gris (*Oenanthe oenanthe*), collalba rubia (*Oenanthe hispanica*) y bisbita campestre (*Anthus campestris*). Estas especies fueron seleccionadas como modelo de estudio porque coexisten y comparten características ecológicas, lo que facilita su comparación. Por ejemplo, todas son insectívoras y anidan en el suelo ([Barrero et al. 2023b; Zurdo et al. 2023](#)).

Las aves fueron capturadas en el marco de un estudio a largo plazo sobre la ecología de estas especies. Se emplearon cepos malla cebados con gusanos de la harina (*Tenebrio molitor*), junto con la reproducción en altavoces de grabaciones específicas de cada para atraer a los individuos. Se capturaron un total de 614 individuos, cubriendo la mayor parte de la zona de estudio ([Fig. 1](#)). Las capturas y la manipulación de los individuos fueron realizadas por anilladores expertos, con el fin de reducir al máximo el tiempo de manipulación y evitar cualquier posible estrés de los individuos. Una vez capturados, todos los individuos fueron anillados con anillas de metal para evitar muestreos en recapturas. Además, se obtuvo la localización de cada captura mediante un GPS. El protocolo seguido para llevar a cabo las capturas y el manejo se realizó bajo permisos de las autoridades españolas y fue aprobado por el Comité Ético Local de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI80-1468-A229).

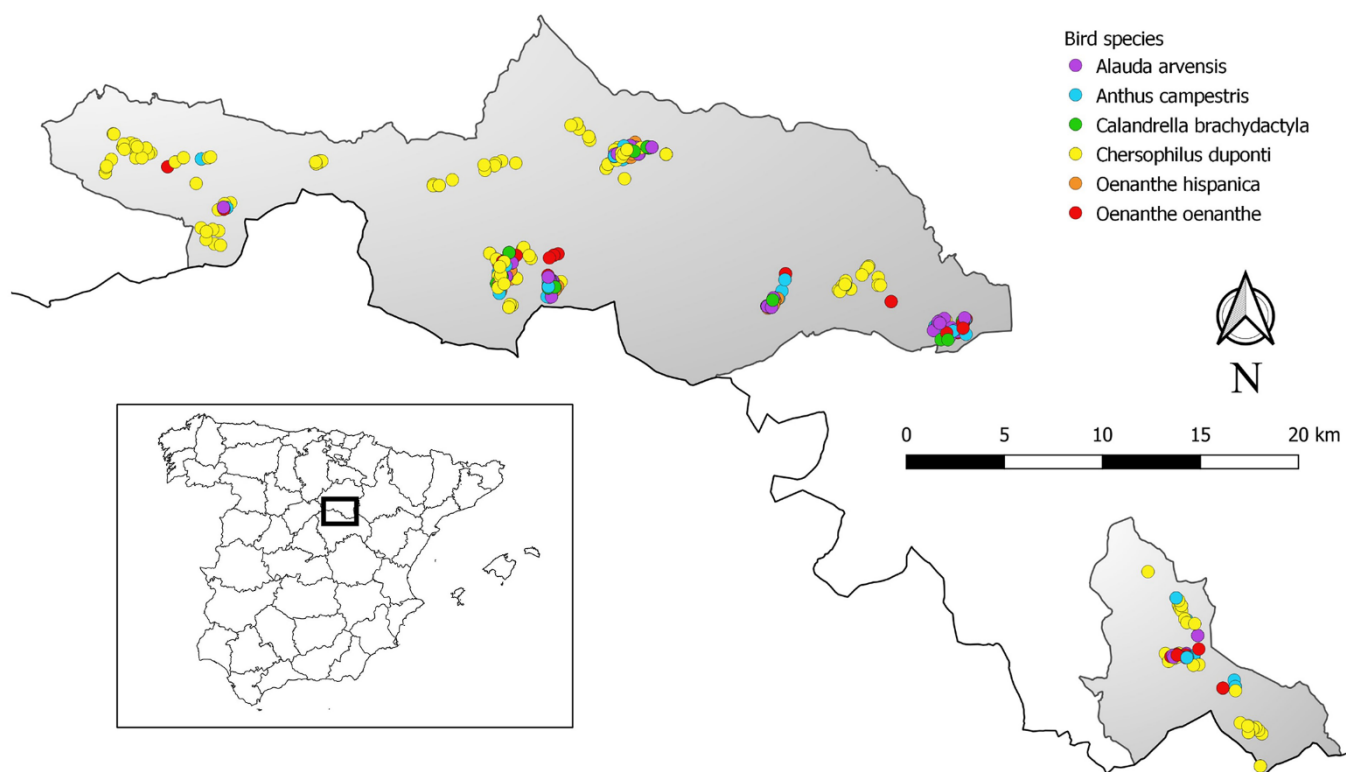


Figura 1. Localización del área de estudio en el sur de la provincia de Soria (rectángulo negro dentro de España), indicando los puntos donde se capturaron individuos de diferentes especies de aves esteparias (puntos de color). En gris se muestran las Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA) de la Red Natura 2000 de la Unión Europea (más al norte, Altos de Barahona, y más al sur, Páramo de Layna).

Figure 1. Location of the study area in southern Soria province (black rectangle within Spain), indicating points where individuals of different steppe bird species were trapped (colour dots). Special Protection Areas (SPAs) of the European Union's Natura 2000 Network are shown in grey (further north, 'Altos de Barahona', and further south, 'Páramo de Layna').

Tras la obtención de medidas morfológicas y muestras biológicas para otros estudios asociados (ver por ejemplo [Bustillo-de la Rosa et al. 2022; Zurdo et al. 2023](#)), buscamos la presencia de garrapatas en cada individuo. Para ello, contamos el número de garrapatas (si estaban presentes) en cada ejemplar capturado y recogimos algunas muestras (una media de 5-6 garrapatas para aquellos individuos con alta infestación, y su totalidad cuando presentaban baja infestación) para ser procesadas posteriormente. Las garrapatas muestreadas se introdujeron en tubos Eppendorf y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis molecular. Las aves fueron liberadas inmediatamente en el lugar donde habían sido capturadas.

Procedimientos de laboratorio

Las garrapatas fueron inicialmente identificadas y posteriormente procesadas en el laboratorio del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC-CSIC, UCLM, JCCM). Se utilizaron claves taxonómicas específicas proporcionadas por Estrada-Peña et al. (2018) para identificar morfológicamente la especie de garrapata, el sexo y su estado de desarrollo (larva, ninfa, adulto).

La extracción de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) de cada garrapata se realizó utilizando Tri Reagent® (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las garrapatas se cortaron en dos mitades longitudinales utilizando una hoja de bisturí desechable, extrayendo su contenido y utilizándolo para la extracción de los ácidos nucleicos. La concentración, calidad y pureza de ARN y ADN se comprobaron con un espectrofotómetro NanoDrop One® (ThermoScientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

La detección de patógenos presentes en garrapatas se llevó a cabo mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de varios fragmentos de genes, mediante PCR convencionales para *Rickettsia* sp. (16S rRNA); Anaplasmataceae, incluyendo *Anaplasma* sp. y *Ehrlichia* sp. (16S rRNA); PCR anidada para Haemosporida, incluyendo *Plasmodium* sp. y *Haemoproteus* sp. (gen citocromo-b); PCR en tiempo real para el gen de inserción IS1111a específico de *Coxiella burnetii*; y RT-PCR en tiempo real para Flavivirus (extremo N-terminal del dominio ARN polimerasa dependiente de ARN). Estos análisis se realizaron para determinar el potencial papel de las garrapatas como vector de enfermedades y como *proxy* de la presencia de infección por malaria aviar en las aves infestadas. Todos los primers y las condiciones de PCR utilizadas en este estudio se muestran en la **Tabla A1** del Anexo.

Las garrapatas se analizaron individualmente para todos los patógenos, excepto para Haemosporida. En este caso, se realizó una PCR anidada analizando las muestras en grupos (pools) de tres garrapatas con el fin de reducir costes. Posteriormente, se analizaron individualmente las garrapatas que componían cualquier pool positivo. Los análisis mediante PCR convencional y PCR anidada se realizaron en un termociclador S1000 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) utilizando el kit de PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.). Los análisis mediante PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real se realizaron en termociclador CFX96 Touch (Bio-Rad) utilizando el kit SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Bio-Rad) y el iTaq Universal SYBR Green One-Step RT-qPCR (Bio-Rad), respectivamente. En todas las PCR llevadas a cabo se utilizó ADN o ARN del patógeno estudiado como control positivo y agua libre de nucleasas como control negativo. Los productos de las PCR convencionales se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% utilizando GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, EE.UU.). Los amplicones se purificaron con QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y fueron enviados a secuenciar a una empresa comercial (Secugen S.L., Madrid, España). Para evaluar el nivel de similitud de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), se utilizó el análisis BLAST (NCBI's Basic Local Alignment Search Tool). Además, las secuencias parciales de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *Plasmodium relictum* obtenidas de garrapatas en este estudio se depositaron en la base de datos GenBank (números de acceso: PQ656542, PQ656543, PQ671638, PQ671639, PQ671640 y PQ671641).

Análisis estadísticos

Se calculó la prevalencia de infestación por garrapatas, definida como el número de individuos de cada especie de ave con presencia de garrapatas en relación con el número total de capturas por especie, considerando conjuntamente machos, hembras y pollos. Además, se estimó el número de parásitos por individuo infestado (intensidad media), de acuerdo con Bush et al. (1997). Del mismo modo, estimamos la probabilidad de infección por parásitos de malaria aviar por especie (número de individuos infestados por garrapata en las que se detectó presencia de malaria aviar) basándonos en los análisis moleculares realizados sobre garrapatas. Como se ha indicado anteriormente, la presencia de malaria aviar en las garrapatas se utilizó como indicador de la potencial infección por malaria de las aves identificadas como hospedadoras de garrapatas, por lo que la probabilidad de infección por malaria aviar se estimó teniendo en cuenta únicamente los individuos portadores de garrapatas.

Para estudiar la influencia potencial del ganado en la probabilidad de infestación de garrapatas en aves, utilizamos la Función de Densidad de Kernel (KDF) para estimar la intensidad de uso del suelo por los rebaños de ovejas utilizando puntos de movimiento recogidos por transmisores GPS, los cuales fueron incorporados en ovejas durante el período de cría de aves (abril-junio de 2018 y 2019; **Fig. 2**). KDF es una representación espacial de la distribución de frecuencia relativa de puntos, donde las áreas con más puntos muestran valores de probabilidad más altos (Worton 1989). Todos los rebaños de ovejas del área de estudio (n = 5) fueron equipados con collares GPS, que consistían en un dispositivo GPS CatLog2 y una batería de litio recargable de 9000 mAh protegida por un tubo de PVC (proporcionado por Perthold Engineering LLC; www.mr-lee.com). Se colocó un collar GPS por rebaño y se programó para obtener una localización cada 30 min. Una descripción detallada de los datos GPS y del procedimiento de limpieza de los datos se puede ver en Gómez-Catasús et al. (2023).

La intensidad ganadera se estimó utilizando un factor de suavizado de 900 y un tamaño de celda de 50×50 m. Además, se asignó el número de ovejas por rebaño como factor de ponderación para cada ubicación GPS y fecha. Consideramos la intensidad ganadera durante el período de cría (es decir, abril-junio de los años 2018 y 2019) como un *proxy* del papel potencial de las ovejas como reservorio de garrapatas en el rango de tiempo en el que todas las especies estudiadas pueden encontrarse juntas.

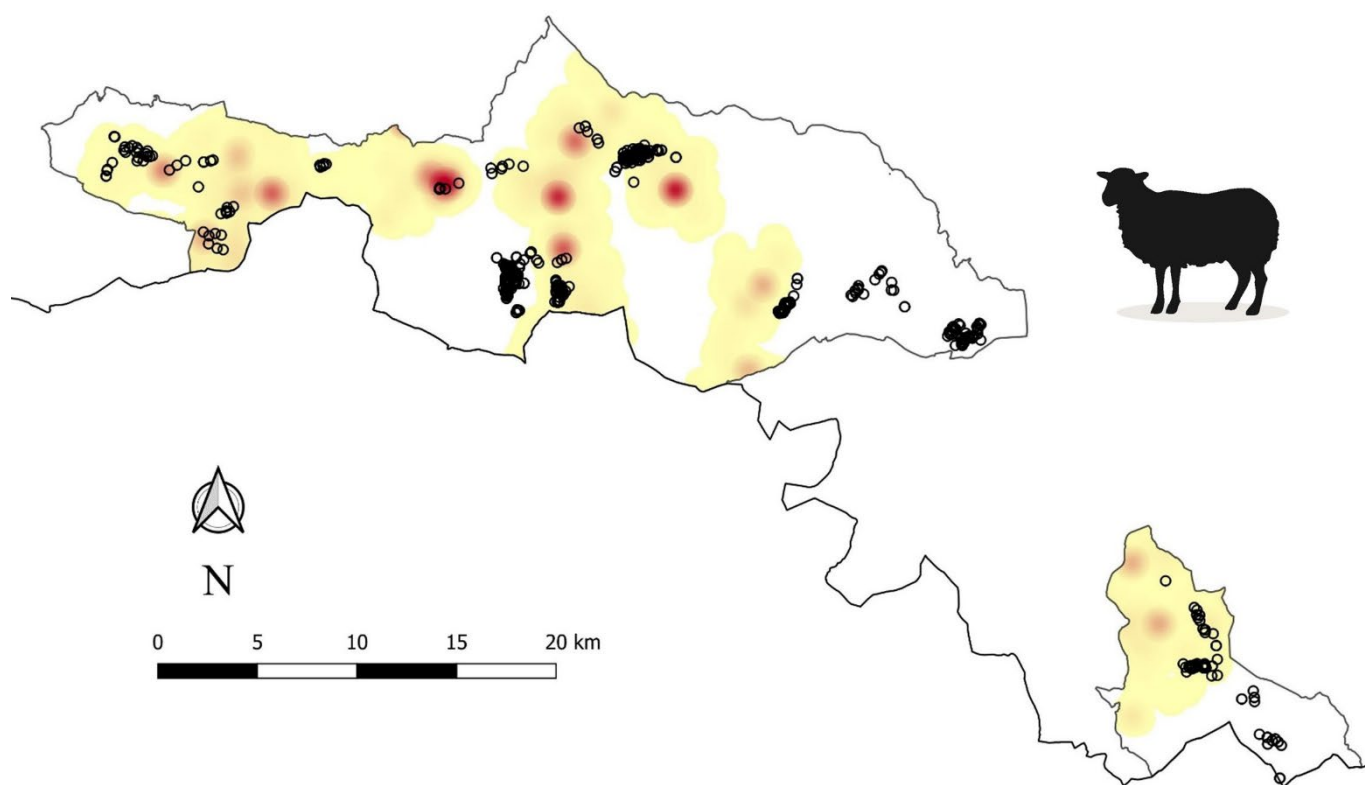


Figura 2. Densidad ganadera en la zona de estudio durante la época de cría, estimada mediante una función de densidad de Kernel (KDF) utilizando localizaciones GPS. Las zonas de baja intensidad se muestran en amarillo, las de alta intensidad en rojo, mientras que las zonas blancas indican ausencia de pastoreo. Los puntos muestran la ubicación de las capturas de aves.

Figure 2. Livestock density at the study area during the breeding season, estimated by a Kernel Density Function (KDF) using GPS locations. Low intensity areas are shown in yellow, high intensity areas in red, while white areas indicate no grazing. Dots show the location of bird captures.

Utilizamos la función *glmer* del software R (versión 3.6.1; [R Core Team 2019](#)) para ejecutar una regresión logística binaria de efectos mixtos con el fin de abordar si la prevalencia de garrapatas variaba entre especies. En primer lugar, utilizamos la presencia/ausencia de garrapatas (1/0 respectivamente) como variable de respuesta, y la especie de ave como factor fijo para determinar las diferencias interespecíficas en la probabilidad de presencia de garrapatas. Como la mayoría de las especies estudiadas (todas, excepto la alondra ricotí) son migratorias, incluimos el mes de captura como variable aleatoria para tener en cuenta el posible sesgo debido al momento de llegada de cada especie a la zona de estudio. En segundo lugar, utilizamos una regresión logística binaria de efectos mixtos para evaluar la posible influencia de la intensidad del pastoreo en la probabilidad de presencia de garrapatas. En este caso, calculamos la intensidad de pastoreo como el valor medio de KDF en un buffer de 50 metros alrededor de cada punto de captura y lo utilizamos como variable explicativa, manteniendo la presencia/ausencia de garrapatas (1/0 respectivamente) como variable respuesta. En este análisis incluimos la especie de ave como variable aleatoria. Se repitieron ambos tipos de análisis, pero utilizando como variable de respuesta la presencia o ausencia de infección por malaria aviar. Los análisis de la posible influencia de la intensidad ganadera en la probabilidad de infestación por garrapatas y malaria aviar se realizaron considerando únicamente los datos de 2018 y 2019, ya que es el periodo en el que se controlaron los rebaños de ovejas. Los predictores continuos fueron z-estandarizados (media = 0 y desviación estándar = 1).

Resultados

De 2017 a 2021 se capturaron un total de 614 aves en la zona de estudio. De ellos, 141 individuos fueron identificados como hospedadores de garrapatas (112 alondras ricotí, 11 alondras comunes, 5 terreras comunes, 1 collalba gris, 1 collalba rubia y 11 bisbitas campestres). Todas las garrapatas extraídas de las aves se identificaron como *Haemaphysalis punctata*. La mayoría de ellas mostraban un estadio de ninfa, con un solo macho adulto y dos larvas. Los análisis moleculares mostraron la presencia de distintos patógenos (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. y *Plasmodium relictum*) en garrapatas de varias especies de aves ([Tabla 1](#)).

Tabla 1. Resumen de los resultados de PCR (nº positivos/nº analizados) para patógenos analizados en las garrapatas *Haemaphysalis punctata* obtenidos de aves capturadas en Soria entre 2017 y 2021.

Table 1. Summary of the PCR results (no. positives/no. analysed) for pathogens analysed in ticks *Haemaphysalis punctata* removed from birds captured in Soria between 2017 and 2021.

Patógeno	Especies de aves						Total
	Alondra común	Bisbita campestre	Terrera común	Alondra ricotí	Collalba rubia	Collalba gris	
<i>Rickettsia</i> spp.	0/16	0/7	0/7	0/292	0/2	0/2	0/326
Anaplasmataceae	0/16	0/7	0/7	2/292	0/2	0/2	2/326
Haemosporida	0/16	0/7	0/7	17*/292	1/2	0/2	18/326
<i>Coxiella burnetii</i>	0/16	0/7	0/7	0/292	0/2	0/2	0/326
Flavivirus	0/16	0/7	0/7	0/292	0/2	0/2	0/326

* Tasa de infección mínima. Garrapatas analizadas en pool.

La probabilidad de presencia de garrapatas fue significativamente mayor en la alondra ricotí en comparación con el resto de las especies ($\chi^2 = 90.01$, $df = 5$, $P < 0.001$) (Fig. 3), sin variación significativa entre las demás especies. El 46.3% de los individuos capturados de alondra ricotí tuvieron garrapatas, mostrando el mayor valor de infestación, seguida del bisbita campestre (14.5%). La presencia de garrapatas en las otras dos alondras y en ambas collalbas fue inferior al 9% (Tabla 2). Por otro lado, la malaria aviar (considerada por la presencia de *Plasmodium relictum*) fue la infección más común detectada. No obstante, sólo estaba presente en garrapatas de dos especies, la alondra ricotí y la collalba rubia, con tasas de prevalencia del 21.6% y el 100% (aunque en sólo dos garrapatas), respectivamente (Tabla 2). *Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp. sólo se detectaron en garrapatas procedentes de la alondra ricotí (Tabla 1).

Con respecto a la secuenciación molecular, 5 de las 17 muestras positivas a la PCR convencional anidada para la detección de Haemosporida pudieron ser secuenciadas, mostrando una homología entre 97.50% y 100% con otras secuencias de *Plasmodium relictum* aisladas de diferentes aves (Japón, LC230047.1; Austria, MK652233.1). Las secuencias de nucleótidos de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. mostraron homologías de 99.66% con una secuencia obtenida de una garrapata (Belice, ON107291.1) y de 100% aislada de un murciélago (Brasil, PP109409.1), respectivamente.

Tabla 2. Número de aves (machos, hembras y pollos) por especie capturados en Soria entre 2017 y 2021 y distribución de *Haemaphysalis punctata* según las especies de aves. También se muestra el porcentaje de detección de malaria aviar en las garrapatas analizadas (número y proporción de individuos con garrapatas positivas a malaria).

Table 2. Number of birds (males, females and chicks) per species captured in Soria between 2017 and 2021 and distribution of *Haemaphysalis punctata* according to the birds species. Percentage of avian malaria detected in ticks analyzed (number and proportion of individuals with ticks. positive to avian malaria) is also shown.

Especies de aves	Aves capturadas	Aves con garrapatas (%)	Total de garrapatas	Intensidad media	Garrapatas positivas a malaria (%)
Alondra común	129	11 (8.5)	21	1.9	0
Bisbita campestre	76	11 (14.5)	12	1.1	0
Terrera común	65	5 (7.7)	16	3.2	0
Alondra ricotí	242	112 (46.3)	409	3.7	19 (21.6)
Collalba rubia	60	1 (1.7)	2	2	1 (100)
Collalba gris	42	1 (2.4)	2	2	0
Total	614	141	462		

La prevalencia de garrapatas no varió significativamente en función de la intensidad ganadera ($\chi^2 = 0.29$; $df = 1$; $P = 0.59$). La prevalencia de la malaria aviar obtenida a partir del análisis molecular de la sangre de garrapatas no varió significativamente entre especies ($\chi^2 = 0$; $df = 5$; $P = 1$). La probabilidad de estar infectado por malaria aviar no varió significativamente en función de la intensidad de pastoreo ($\chi^2 = 1.11$; $df = 1$; $P = 0.29$).

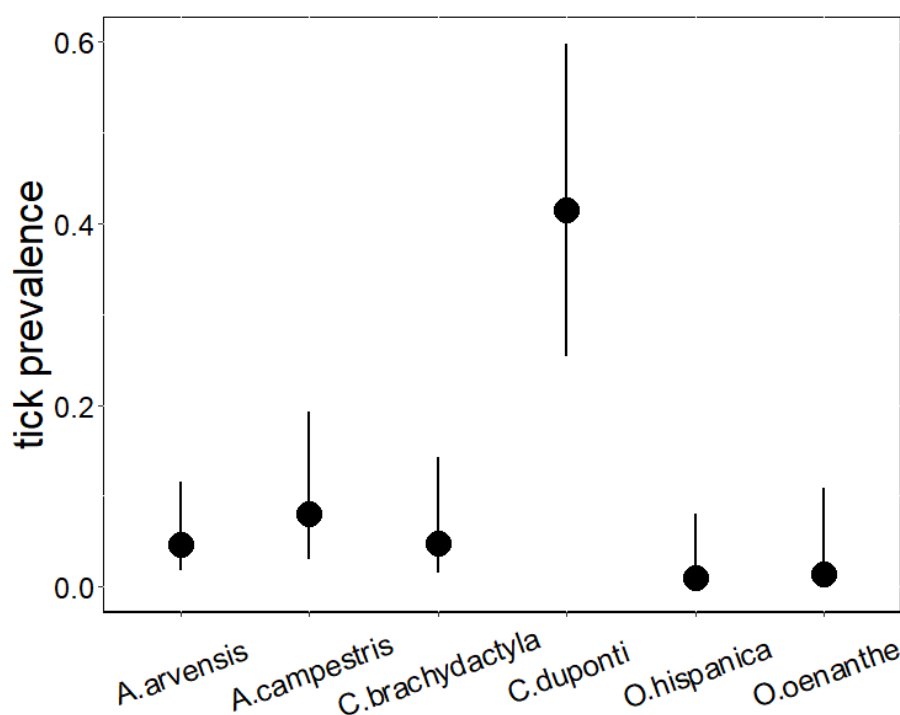


Figura 3. Media predicha e intervalo de confianza (IC) al 95% para la prevalencia de garrapatas en diferentes especies de aves esteparias en Soria (España) obtenida a partir de una regresión logística mixta (*glmer*) de la variación de la prevalencia de garrapatas frente a la especie, utilizando el mes de captura como variable aleatoria.

Figure 3. Predicted mean and 95%-CI for tick prevalence on different steppe bird species in Soria (Spain) obtained from the mixed-effect binary logistic regression (*glmer*) of tick prevalence variation against the species, using the month of capture as a random variable.

Discusión

En este estudio proporcionamos una de las primeras descripciones de la prevalencia de garrapatas y malaria aviar en especies simpátricas de aves esteparias, uno de los grupos de vertebrados más amenazados de Europa (Agencia Europea de Medio Ambiente 2015). Encontramos garrapatas en todas las especies monitorizadas, aunque su prevalencia varió mucho entre especies, con una prevalencia de garrapatas significativamente mayor en la especie más amenazada y con más individuos muestreados, la alondra ricotí. La infección por malaria aviar sólo se detectó en dos de las especies estudiadas, la alondra ricotí y la collalba rubia. También se evaluó el posible papel del ganado doméstico como reservorio de la infestación parasitaria de las aves y como atrayente de otros insectos vectores portadores de malaria. Sin embargo, el pastoreo de ovejas no parece estar relacionado con la prevalencia de infestación por garrapatas, ni con la presencia de malaria aviar hallada en nuestro estudio.

Todas las garrapatas identificadas pertenecían a la especie *Haemaphysalis punctata*, la cual ha sido descrita como una especie con una amplia distribución en la región paleártica y común en estadio inmaduro en passeriformes (Pfäffle et al. 2018; Keve et al. 2022). Aunque todas las especies fueron identificadas como hospedadoras de esta especie de garrapata, su prevalencia varió significativamente entre ellas. La alondra ricotí mostró la prevalencia más alta, debido potencialmente a diferencias biológicas y de comportamiento con respecto a las otras especies, que no mostraron diferencias significativas entre ellas en la prevalencia de garrapatas. Aunque todas las especies observadas nidifican en el suelo (Cramp y Simmons 1980; Barrero et al. 2023b), la alondra ricotí es la única residente. Su carácter residente, junto con su alta especificidad de hábitat (Seoane et al. 2006; Gómez-Catasús et al. 2019), podría explicar la mayor presencia de garrapatas debido a la exposición durante todo el año a la potencial infestación (Hornok et al. 2014) como segundos hospedadores de ninfas o adultos (Klaus et al. 2016), los cuales se alimentan principalmente de ungulados (en este caso, ovejas) (Pfäffle et al. 2018).

Los resultados sobre presencia de patógenos detectados en garrapatas (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. y *Plasmodium relictum*) nos indican que las aves infestadas podrían estar actuando como reservorio de estos (Hornok et al. 2014; Defaye et al. 2023). Por un lado, la presencia de *Anaplasma* spp. o *Ehrlichia* spp., patógenos transmitidos por garrapatas, podría asociarse a su conocido papel como vectores de estos patógenos (Hasle 2013), no garantizando que las especies de aves estén infectadas. Por otro lado, la detección en las garrapatas analizadas de *Plasmodium relictum*, parásito de la malaria aviar con una distribución mundial (Beadell et al. 2006; Ferraguti et al. 2023) y cuya vía de transmisión es por mosquitos, podría estar indicando que las aves hospedadoras de dichas garrapatas han sido parasitadas por otros vectores portadores de malaria. Nuestros resultados deben interpretarse con cautela debido al reducido número de muestras analizadas para algunas especies y a la falta de muestras de aves no infestadas por garrapatas en nuestros análisis. No obstante, la prevalencia de malaria aviar en las garrapatas extraídas de alondra ricotí, la única especie con un gran número de individuos analizados (112 aves), alcanzó un 21.6%, un valor muy similar a la prevalencia media de malaria aviar estimada en todo el mundo (Yan et al. 2024). Estos resultados muestran cómo las garrapatas podrían utilizarse como *proxy* para evaluar, de forma no invasiva, la presencia potencial de agentes de

enfermedades infecciosas que pueden encontrarse en el torrente sanguíneo. Aunque se han encontrado algunos individuos infectados por malaria aviar, aquí no podemos concluir sobre su patogenicidad (Marzal 2012). Su impacto potencial sobre la salud y el estado físico de los individuos, o la ausencia de impacto, parece estar relacionado con el grado de infección (es decir, la tasa de parasitemia), la condición de los individuos o la inmunidad adaptativa de la especie (Matson y Beadell 2010; Granthon y Williams 2017; Bustillo-de la Rosa et al. 2022; Muriel et al. 2023). Así pues, deberían llevarse a cabo más estudios centrados en el estudio del impacto potencial de la malaria aviar en las aves silvestres, especialmente en el caso de las especies amenazadas.

Aunque esperábamos encontrar una relación entre la presencia de ganado ovino y las tasas de prevalencia de garrapatas y malaria aviar, no obtuvimos ninguna influencia significativa de la intensidad de pastoreo. No obstante, estos resultados deben considerarse con cautela, pues los datos sobre el pastoreo se limitaron a dos temporadas reproductoras, lo que redujo drásticamente el tamaño de la muestra disponible para este análisis, pudiendo subestimar el papel potencial del ganado como reservorio de garrapatas y atrayente de insectos. Es necesario seguir investigando con un mayor número de especies de aves (migratorias y residentes) en lugares con un régimen de pastoreo variable para dilucidar si el ganado doméstico tiene potencial para influir en la infestación parasitaria de las aves.

Nuestro estudio aporta los primeros datos sobre la infestación por garrapatas y su potencial papel indicador de infección por malaria aviar en passeriformes esteparios. Tomamos muestras de un gran número de aves y descubrimos que casi una cuarta parte de los individuos estaban infestados por garrapatas. Nuestros análisis también mostraron que la tasa de prevalencia de garrapatas variaba entre las especies, con una mayor tasa de infestación en la especie más amenazada, la alondra ricotí. A diferencia de la infestación por garrapatas, el porcentaje de aves infectadas por malaria aviar fue bajo y, probablemente debido al escaso tamaño de la muestra, no encontramos ninguna relación significativa entre la infección por malaria aviar y otros factores, como la variación de su prevalencia entre especies. Aunque descubrimos que ni la infestación por garrapatas ni por malaria aviar estaban asociadas a la presión del pastoreo ovino, futuras investigaciones deberían abarcar una escala temporal mayor con el fin de evaluar la posible relación entre la infestación de aves y la fauna doméstica. Del mismo modo, sería deseable que futuros estudios que analicen la infestación de garrapatas y malaria aviar en aves consideren individuos infestados e individuos control (sin ectoparásitos). De esta forma se podría demostrar de forma directa el uso de garrapatas como indicadores de infección en sus hospedadores, o el potencial impacto que puede tener la infección por malaria aviar sobre su sistema inmunitario (por ejemplo, relación heterófilo/linfocito como indicador de estrés fisiológico; Bustillo-de la Rosa et al. 2022), condición física o tasa de supervivencia, para mejorar nuestro conocimiento actual sobre su impacto en la dinámica poblacional de las aves.

Contribución de los autores

Daniel Bustillo-de la Rosa: Conceptualización del estudio; tratamiento de datos; análisis; investigación; metodología; redacción del borrador original, revisión y edición. Adrián Barrero: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito. Julia Gómez-Catasús: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito. Margarita Reverter: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito. Julia Zurdo: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito. Cristian Pérez-Granados: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito. Marta Sánchez-Sánchez: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito; contribución igual en metodología. Isabel G. Fernández-De-Mera: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito. Ursula Höfle: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito. Manuel B. Morales: apoyo en la investigación, redacción, revisión y edición del manuscrito. Juan Traba: Conceptualización del estudio; tratamiento de datos; análisis; investigación; metodología; redacción del borrador original; apoyo en la revisión y edición; Supervisión; Obtención de financiación.

Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Disponibilidad de datos

Los datos empleados para este estudio se encuentran disponibles en Figshare: https://figshare.com/articles/dataset/Datos_Garrapatas_Ecosistemas_csv/28352375?file=52154420

Financiación, permisos requeridos, potenciales conflictos de interés y agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI; C/3868/05), y los proyectos LIFE Ricotí (LIFE15-NAT-ES-000802) y LIFE Connect Ricotí (LIFE20-NAT-ES-000133), apoyados por la Comisión Europea. La investigación también ha sido parcialmente apoyada por el Ministerio de Ciencia e Innovación español con la subvención ERTA-2017-0003-C02-01, y por la subvención 2022-GRIN-34227 financiada por la UCLM y FEDER. El Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (CSIC-UCLM-JCCM), proporcionó el laboratorio para el análisis de ADN. Esta es una contribución a la Red REMEDINAL-TE (ES2018-EMT-4338).

Los autores/as declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Aranbarri, J., González-Sampériz, P., Iriarte, E., Moreno, A., Rojo-Guerra, M., Peña-Chocarro, L., Valero-Garcés, B., et al. 2015. Human-landscape interactions in the Conquezueta-Ambrona Valley (Soria, continental Iberia): from the early Neolithic land use to the origin of the current oak woodland. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol* 436, 41–57. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2015.06.030>
- Atkinson, C.T. 2008. Avian Malaria. In: Atkinson, C.T., Thomas, N.J., Hunter, D.B. (eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*, pp. 35-53. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780813804620.ch3>
- Atkinson, C.T., LaPointe, D.A. 2009. Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers. *Journal of avian medicine and surgery* 23(1), 53–63. <https://doi.org/10.1647/2008-059.1>
- Barrero, A., Gómez-Catasús, J., Traba, J., Ovaskainen, O. 2023a. Co-occurrence patterns in a steppe bird community: insights into the role of dominance and competition. *Oikos* e09780. <https://doi.org/10.1111/oik.09780>
- Barrero, A., Cortés Caballero, B., Reverter, M., Gómez-Catasús, J., Bustillo-de la Rosa, D., Zurdo, J., Pérez-Granados, C., et al. 2023b. Nest features and nesting niche segregation in five Iberian steppe passerine. *Ardeola* 70(2): 201-224. <https://doi.org/10.13157/arla.70.2.2023.ra4>
- Barrero, A., Tarjuelo, R., Traba, J. 2024 Increased Density of Conspecifics Caused Niche Contraction in a Multispecific Passerine Assemblage. *Ecology* 105: e4296. <https://doi.org/10.1002/ecy.4296>
- Beadell, J.S., Ishtiaq, F., Covas, R., Melo, M., Warren, B.H., Atkinson, C.T., Bensch, S., et al. 2006. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273(1604), 2935–2944. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3671>
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Örfjan, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H., Pinheiro, R.T. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267(1452), 1583-1589. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1181>
- Bensch, S., Hellgren, O., Pérez-Tris, J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9(5), 1353-1358. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x>
- Brinkerhoff, R.J., Dang, L., Streby, H.M., Gimpel, M. 2019. Life history characteristics of birds influence patterns of tick parasitism. *Infection Ecology & Epidemiology* 9(1), 1547096. <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1547096>
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W. 1997. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of parasitology* 83(4), 575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>
- Bustillo-de la Rosa, D., Calero-Riestra, M., Pérez-Granados, C., Mereu, S., Morales, M.B., Traba, J., López-Iborra, G., et al. 2022. Leukocyte profile variation in Dupont's Lark (*Chersophilus duponti*) in Spain and Morocco. *Journal of Ornithology* 163, 539-551. <https://doi.org/10.1007/s10336-021-01958-x>
- Centeri, C. 2022. Effects of grazing on water erosion, compaction and infiltration on grasslands. *Hydrology* 9(2), 34. <https://doi.org/10.3390/hydrology9020034>
- Cramp, S., Simmons, K.E.I. 1980. Birds of the Western Palearctic (vol. 2). Oxford University Press. Oxford, UK.
- Defaye, B., Moutailler, S., Pasqualini, V., Quilichini, Y. 2022. Distribution of tick-borne pathogens in domestic animals and their ticks in the countries of the Mediterranean basin between 2000 and 2021: A systematic review. *Microorganisms* 10(6), 1236. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061236>
- Defaye, B., Moutailler, S., Vollot, B., Galon, C., Gonzalez, G., Moraes, R.A., Leoncini, A.S., et al. 2023. Detection of Pathogens and Ticks on Sedentary and Migratory Birds in Two Corsican Wetlands (France, Mediterranean Area). *Microorganisms* 11(4), 869. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040869>
- Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Sanchez, A.C. 2013. The role of habitat fragmentation on the evolutionary history of tick-borne pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00029>
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D., Petney, T.N. (Eds.). 2018. *Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification*. Springer International Publishing AG. <https://doi.org/10.1111/mve.12410>
- European Environment Agency 2015. *State of nature in the EU. Results from reporting under the nature directives 2007–2012*. European Environment Agency, Technical Report No. 2/2015.
- Ferraguti, M., Martínez-de la Puente, J., Bensch, S., Roiz, D., Ruiz, S., Viana, D. S., Soriguer, R.D., et al. 2018. Ecological determinants of avian malaria infections: an integrative analysis at landscape, mosquito and vertebrate community levels. *Journal of Animal Ecology*, 87(3), 727-740. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12805>
- Ferraguti, M., Magallanes, S., Jiménez-Peñuela, J., Martínez-de la Puente, J., García-Longoria, L., Figuerola, J., Muriel, J., et al. 2023. Environmental, geographical and time-related impacts on avian malaria infections in native and introduced populations of house sparrows (*Passer domesticus*), a globally invasive species. *Global Ecology and Biogeography* 32, 809–823. <https://doi.org/10.1111/geb.13651>
- Ghosh, S., Bansal, G.C., Gupta, S.C., et al. 2006. Status of tick distribution in Bangladesh, India and Pakistan. *Parasitology Research* 99(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0684-7>
- Gómez-Catasús, J., Garza, V., Morales, M.B., Traba, J. 2019. Hierarchical habitat-use by an endangered steppe bird in fragmented landscapes is associated with large connected patches and high food availability. *Scientific Reports* 9(1), 19010. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55467-2>
- Gómez-Catasús, J., Reverter, M., Bustillo-de la Rosa, D., Barrero, A., Pérez-Granados, C., Zurdo, J., Traba, J. 2023. Moderate sheep grazing increases arthropod biomass and habitat use by steppe birds. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 354, 108556. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2023.108556>
- González-Quevedo, C., Davies, R.G., Richardson, D.S. 2014. Predictors of malaria infection in a wild bird population: landscape-level analyses reveal climatic and anthropogenic factors. *Journal of animal ecology* 83(5), 1091-1102. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12214>
- Granthon, C., Williams, D.A. 2017. Avian malaria, body condition, and blood parameters in four species of songbirds. *The Wilson Journal of Ornithology* 129(3), 492-508. <https://doi.org/10.1676/16-060.1>
- Hasle, G. 2013. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3, 48. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00048>
- Heylen, D., Matthysen, E. 2008. Effect of tick parasitism on the health status of a passerine bird. *Functional Ecology* 22, 1099 - 1107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01463.x>
- Hornok, S., Kováts, D., Csörgő, T., Meli, M.L., Gönczi, E., Hadnagy, Z., Takács, N., et al. 2014. Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. *Parasites & vectors* 7, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-128>
- Keve, G., Sándor, A.D., Hornok, S. 2022. Hard ticks (Acari: Ixodidae) associated with birds in Europe: Review of literature data. *Frontiers in Veterinary Science* 9, 928756. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.928756>

- Klaus, C., Gethmann, J., Hoffmann, B., Ziegler, U., Heller, M., Beer, M. 2016. Tick infestation in birds and prevalence of pathogens in ticks collected from different places in Germany. *Parasitology research*, 115(7), 2729-2740. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5022-5>
- LaPointe, D.A., Atkinson, C.T., Samuel, M.D. 2012. Ecology and conservation biology of avian malaria. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1249(1), 211-226. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06431.x>
- Loss, S.R., Noden, B.H., Hamer, G.L., Hamer, S.A. 2016. A quantitative synthesis of the role of birds in carrying ticks and tick-borne pathogens in North America. *Oecologia* 182, 947-959. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3731-1>
- Matson, K.D., Beadell, J.S. 2010. Infection, immunity, and island adaptation in birds. *The biogeography of host-parasite interactions* 217.
- Marzal, A. 2012. Recent advances in studies on avian malaria parasites. *Malaria parasites*, 30, 135-158. <https://doi.org/10.5772/33730>
- Marzal, A., de Lope, F., Navarro, C., Møller, A.P. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142(4), 541-545. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1757-2>
- Merino, S., Møller, A.P. 2010. Host-parasite interactions and climate change. *Effects of climate change on birds* 15, 213-226.
- Moureaux, G., Temmam, S., Gonzalez, J.P., Charrel, R.N., Grard, G., De Lamballerie, X. 2007. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7(4), 467-478. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0206>
- Muriel, J., Garcia-Longoria, L., Magallanes, S., Ortiz, J.A., Marzal, A. 2023. Avian malaria, haematocrit, and body condition in invasive wetland passerines settled in southwestern Spain. *Avian Research* 14, 100081. <https://doi.org/10.1016/j.avrs.2023.100081>
- Norte, A.C., Lobato, D.N.C., Braga, E.M., Antonini, Y., Lacorte, G., Gonçalves, M., Lopes de Carvalho, I., et al. 2013. Do ticks and *Borrelia burgdorferi* sl constitute a burden to birds? *Parasitology research* 112, 1903-1912. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3343-1>
- Ogden, N.H., Lindsay, L.R., Hanincová, K., Barker, I.K., Bigras-Poulin, M., Charron, D.F., Heagy, A., et al. 2008. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 74(6), 1780-1790. <https://doi.org/10.1128/AEM.01982-07>
- Ogden, N.H., Ben Beard, C., Ginsberg, H.S., Tsao, J.I. 2021. Possible effects of climate change on ixodid ticks and the pathogens they transmit: Predictions and observations. *Journal of Medical Entomology* 58(4), 1536-1545. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa220>
- Palomar, A.M., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., Santibáñez, S., Portillo, A., Oteo, J.A. 2012. Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain, 2009. *Emerging infectious diseases* 18(7), 1188. <https://doi.org/10.3201/eid1807.111777>
- Pfäffle, M.P., Santos-Silva, M.M., Jaenson, T.G.T., Vatansever, Z., Petney, T.N. 2018. *Haemaphysalis punctate*, Canestrini. *Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification* 237. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63760-0_46
- R Core Team 2019. R: A language and environment for statistical computing, version 3.6.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., Schaefer, H.M. 2012. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews* 87(4), 928-964. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00234.x>
- Seoane, J., Justribo, J.H., García, F., Retamar, J., Rabadan, C., Atienza, J.C. 2006. Habitat-suitability modelling to assess the effects of land-use changes on Dupont's lark *Chersophilus duponti*: a case study in the Layna Important Bird Area. *Biological Conservation* 128(2), 241-252. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.032>
- Simon, J.A., Marrotte, R.R., Desrosiers, N., Fiset, J., Gaitan, J., Gonzalez, A., Koffi, J.K., et al 2014. Climate change and habitat fragmentation drive the occurrence of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, at the northeastern limit of its distribution. *Evolutionary Applications* 7(7), 750-764. <https://doi.org/10.1111/eva.12165>
- Sparagano, O., George, D., Giangaspero, A., Špitalská, E. 2015. Arthropods and associated arthropod-borne diseases transmitted by migrating birds. The case of ticks and tick-borne pathogens. *Veterinary parasitology* 213(1-2), 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.028>
- Springer, A., Glass, A., Topp, A.K., Strube, C. 2020. Zoonotic tick-borne pathogens in temperate and cold regions of Europe—a review on the prevalence in domestic animals. *Frontiers in veterinary science* 7, 604910. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.604910>
- Stuen, S., Nevland, S., Moum, T. 2003. Fatal cases of tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990(1), 433-434. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07407.x>
- Tilburg, J.J., Melchers, W.J., Pettersson, A.M., Rossen, J.W., Hermans, M.H., van Hannen, E.J., Nabuurs-Franssen, M.H., et al. 2010. Interlaboratory evaluation of different extraction and real-time PCR methods for detection of *Coxiella burnetii* DNA in serum. *Journal of clinical microbiology* 48(11), 3923-3927. <https://doi.org/10.1128/JCM.01006-10>
- Valkiūnas, G. 2005. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203643792>
- Valkiūnas, G., Iezhova, T.A. 2018. Keys to the avian malaria parasites. *Malaria Journal* 17, 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2359-5>
- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., Ottosson, U. 2002. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular ecology* 11(8), 1545-1554. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01523.x>
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Östman, Ö. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90(1), 191-194. <https://doi.org/10.1645/GE-3221RN>
- Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E., Dasch, G.A., Mallavia, L.P., Baca, O., Mandelco, L., et al. 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *Journal of bacteriology* 171(8), 4202-4206. <https://doi.org/10.1128/jb.171.8.4202-4206.1989>
- Worton, B.J. 1989. Kernel methods for estimating the utilization distribution in home-range studies. *Ecology* 70 (1), 164-168. <https://doi.org/10.2307/1938423>
- Yan, W.L., Sun, H.T., Zhao, Y.C., Hou, X.W., Zhang, M., Zhao, Q., Elsheikha, H.M., et al. 2024. Global prevalence of Plasmodium infection in wild birds: A systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science* 105136. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105136>
- Zurdo, J., Baonza, J., Traba, J. 2021. New insights on plant communities and flora of the southern páramos of the Iberian range (Spain). *Phytocoenologia* 50, 371-382. <https://doi.org/10.1127/phyto/2021/0381>
- Zurdo, J., Barrero, A., da Silva, L.P., Bustillo-de la Rosa, D., Gómez-Catasús, J., Morales, M.B., Traba, J., et al. 2023. Dietary niche overlap and resource partitioning among six steppe passerines of Central Spain using DNA metabarcoding. *Ibis* 165, 905-923. <https://doi.org/10.1111/ibi.13188>

Anexo 1 / Appendix 1

Tabla A1. Secuencias de primers y condiciones de PCR empleadas para la amplificación de marcadores genéticos.

Table A1. Primer sequences and PCR conditions used for amplification of the genetic markers.

Target	Genetic markers (fragment size)		Primer sequence 5'-3'	PCR type	Annealing: t (s) - T ^a (°C)	Reference
<i>Rickettsia</i> spp.	Ribosomal RNA subunit 16S: fD1 16S rRNA (416 bp)	F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Conventional PCR	30 s at 54 °C	(Weisburg et al. 1989)
		R	AACGTCATTATCTTCCTTGC			
<i>Anaplasmataceae</i>	Ribosomal RNA subunit 16S: 16SANA (421 bp)	F	CAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAAC	Conventional PCR	30 s at 42 °C	(Stuen et al. 2003)
		R	GAGTTTGCCGGGACTTCTTCTGTA			
<i>Coxiella burnetii</i>	Transposase gene: ISCIIIa (78 bp)	F	GTGGTGCCAAGCGATTTTAT	qPCR	30 s at 60 °C	(Tilburg et al. 2010)
		R	GTTTCATCCGCGGTGTTAAT			
		P	FAM-TTTAGCGAGCGAAGCGGTGG-TAMRA			
Haemosporida	Cytochrome- <i>b</i> gene: HAEM 1 (580 bp)	F	CATATATTAAGAGAATTATGGAG	Nested PCR	30 s at 50 °C	(Bensch et al. 2000)
		R	AGAGGTGTAGCATATCTATCTAC			
	Cytochrome- <i>b</i> gene: HAEM 2 (524 bp)	F	ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG			(Waldenström et al. 2004)
		R	GCATTATCTGGATGTGATAATGGT			
Flavivirus	N-terminal end of the RNA-dependent RNA polymerase domain: PF1S-PF2R (270 bp)	F	TGYRTBTAYAACATGATGGG	qRT-PCR	30 s at 50 °C	(Moureau et al. 2007)
		R	GTGTCCCAICCNCGNGTRTC			