

УДК 576.893.161.13 : 577.152

© 1993

## ВИРУЛЕНТНОСТЬ, МЕТАЦИКЛОГЕНЕЗ И ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ЛЕЙШМАНИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ В КУЛЬТУРУ ОТ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ф. Ш. Насыров, Р. М. Насырова, В. Д. Каллиникова, В. М. Сафьянова

Изучены вирулентность, метациклогенез и активность некоторых окислительных ферментов *L. major*, *L. tropica*, *L. braziliensis* в процессе культивирования до пассажа на мышцах и хомяках, а также после выделения штаммов из животных в культуру.

Исследование лейшманий как в процессе культивирования, так и в результате пассажей на животных показало, что снижение вирулентности в первом случае и повышение во втором сопровождается изменением одних и тех же свойств промастигот: соответственно подавлением и стимуляцией активности НАДФ-Н-диафоразы, пероксидазы, а также способностью трансформироваться в инвазионные метациклические формы.

Для сохранения вирулентности важны не только абсолютные показатели указанных свойств, но и постепенность их изменения, а также уровень активности ферментов (в том числе и окисляющих янус зеленый Б) в самом начале культивирования.

В предыдущих работах (Насырова, Насыров, 1987; Насыров, Насырова, 1988; Насырова и др., 1988; Каллиникова и др., 1992; Насырова, Насыров, 1992) нами показано, что штаммы *Leishmania major*, выделенные в культуру непосредственно от человека, в процессе длительного культивирования претерпевают определенные изменения вирулентности, морфогенеза и цитохимии промастигот. По мере аттенуирования наряду с падением вирулентности от пассажа к пассажию снижается НАДФ-Н-диафоразная, пероксидазная активность промастиготных форм лейшманий и их способность трансформироваться в так называемые метациклические формы, которые, видимо, являются инвазионными.

В данной работе эти исследования расширены за счет двух других видов лейшманий: *L. tropica* и *L. braziliensis*, а также за счет штаммов более сложной истории их лабораторного содержания. Штаммы выделялись в культуру не непосредственно от человека, а от лабораторных животных, заражению которых часто предшествовало более или менее длительное содержание штамма в культурах или в криобанке. Поскольку культивирование приводит к падению вирулентности, а пассирование на животных — к ее повышению (Келлина, 1982; Емельянова, Сафьянова, 1982), мы могли наблюдать морфогенез лейшманий и активность дыхательных ферментов лейшманий, сопровождающие изменения вирулентности в обоих направлениях.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 6 субштаммов 3 видов лейшманий: *L. major*, *L. tropica*, *L. braziliensis*.

Штамм К<sub>25</sub> *L. tropica* выделен от больного в Баку и для сохранения вирулентности поддерживался на хомяках в течение 32 пассажей (субштамм К<sub>25</sub>А<sub>32</sub>) и 33 пассажей (субштамм К<sub>25</sub>А<sub>33</sub>).

Т а б л и ц а 1

История лабораторного содержания исследованных субштаммов лейшманий  
(выделенных первоначально от человека)History of laboratory cultivation of leishmania substrains examined  
(originally received from a man)

Вид	Штамм	Субштамм	Количество пассажей		
			на хомяке	в культуре	на животном
<i>L. tropica</i>	К <sub>25</sub>	К <sub>25</sub> А <sub>32</sub>			32 (хомяк)
		К <sub>25</sub> А <sub>33</sub>			33 »
<i>L. braziliensis</i>	1В <sub>14</sub>	1В <sub>16</sub>	14	*	2 »
		1В <sub>14</sub> М	14	6	1 (мышь)
<i>L. major</i>	8	ВМ		12	1 »
	5Аш	6Аш <sub>25</sub>		40 *	25 (хомяк)

Примечание. \* Хранение в криобанке.

Штамм 1В<sub>14</sub> *L. braziliensis*, выделенный от больного доктором Ансари и полученный из ВОЗ, также сразу поддерживался на хомяках в течение 14 пассажей, после чего одна его ветвь хранилась в криобанке, а потом прошла еще два пассажа на хомяках (субштамм 1В<sub>16</sub>), а другая — прошла шесть пассажей в культуре и еще один пассаж в мышах (субштамм 1В<sub>14</sub>М).

Штамм 8 *L. major* от больного после 12 пассажей в культуре и снижения вирулентности до средней был введен мышам, где прошел единственный пассаж (субштамм 8М).

Штамм 5Аш *L. major* был выделен от больного в Ашхабаде, прошел 40 пассажей на среде NNN (утратил вирулентность), год содержался в криобанке, а затем для восстановления вирулентности прошел 25 пассажей на хомяках (субштамм 5Аш<sub>25</sub>).

Таким образом, исследованные субштаммы лейшманий существенно различались по своей истории: по давности выделения, виду позвоночного хозяина, числу пройденных в нем пассажей, пребыванию в культуре и т. д. (табл. 1). Но независимо от этих различий в конце концов все субштаммы из животных высеивались в культуру на среде NNN с обогащающей жидкостью, и на протяжении 2—20-го пассажей определялась степень их вирулентности, морфогенез в пределах пассажа и в отдельные дни — активность НАДФ-Н-диафоразы (по Скарпелли), пероксидазы (бензидиновый метод) и способность окислять янус зеленый Б. Для характеристики морфогенеза лейшманий учитывался главным образом процент метациклических промастигот. Активность ферментов выражалась средним (на 50—500 просмотренных клеток) числом гранул — продуктов соответствующих цитохимических реакций. Для характеристики пассажа вычислялось среднее из всех исследованных в его пределах дней.

Для сравнения штаммов, утративших вирулентность и восстановивших ее, субштаммы 8М *L. major* и 1В<sub>14</sub>М *L. braziliensis* были исследованы по всем перечисленным параметрам до и после пассирования на мышах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Все три штамма, вирулентность которых была проверена до введения животным, после пассажа на животных повысили ее: субштаммы 8М и 1В<sub>14</sub>М — после одного пассажа на мышах из средневирулентных стали высоковирулентными, а субштамм 5Аш<sub>25</sub> — из авирулентного после 25 пассажей на хомяках стал слабовирулентным (см. рисунок). Среди остальных субштаммов, выделенных в культуру от хомяков и прошедших в них от 16 до 33 пассажей

(1В<sub>16</sub>, АК<sub>25</sub>А<sub>32</sub>, АК<sub>25</sub>А<sub>33</sub>), тоже не оказалось высоковирулентных. Даже на втором пассаже культивирования они были средне- и низковирулентными.

Независимо от указанных различий в уровне изначальной вирулентности все субштаммы по мере культивирования на искусственной питательной среде опять снижали ее и к 20-му пассажиру стали авирулентными. При этом выделенные от мышей субштаммы 8М и 1В<sub>14</sub>М снизили вирулентность с высшего уровня до полной потери, субштаммы 1В<sub>16</sub> и АК<sub>25</sub>А<sub>33</sub> сохраняли исходный средневирулентный уровень весьма долго (до 6—10 пассажей), а субштаммы АК<sub>25</sub>А<sub>32</sub> и 5Аш<sub>25</sub> утратили вирулентность раньше других — уже на 3—6-м пассажах.

Лейшмании всех трех исследованных видов проходили в каждом пассаже последовательную смену одних и тех же морфологических типов промастигот: темных, просветляющихся, светлых и метациклических.

По мере культивирования (до введения культур животным или после выделения паразитов из животных в культуру) параллельно со снижением вирулентности штаммы постепенно утрачивали способность к полному морфогенезу, к финальной трансформации: продукция метациклических форм снижалась от пассажа к пассажиру (см. рисунок, А). Субштаммы проходили этот путь с разной скоростью. Наиболее постепенно метациклогенез ослабевал у тех субштаммов, которые дольше сохраняли свою вирулентность неизменной (1В<sub>16</sub>, АК<sub>25</sub>А<sub>33</sub>). И наоборот, те субштаммы, которые резко снижали продукцию метациклических форм (К<sub>25</sub>А<sub>32</sub>, 5Аш<sub>25</sub>М), особенно быстро теряли вирулентность.

Те субштаммы, про которые известно, что они повысили свою вирулентность в результате пребывания в животном (8М, 1В<sub>14</sub>М), одновременно увеличили и продукцию метациклических форм хотя и в разной степени.

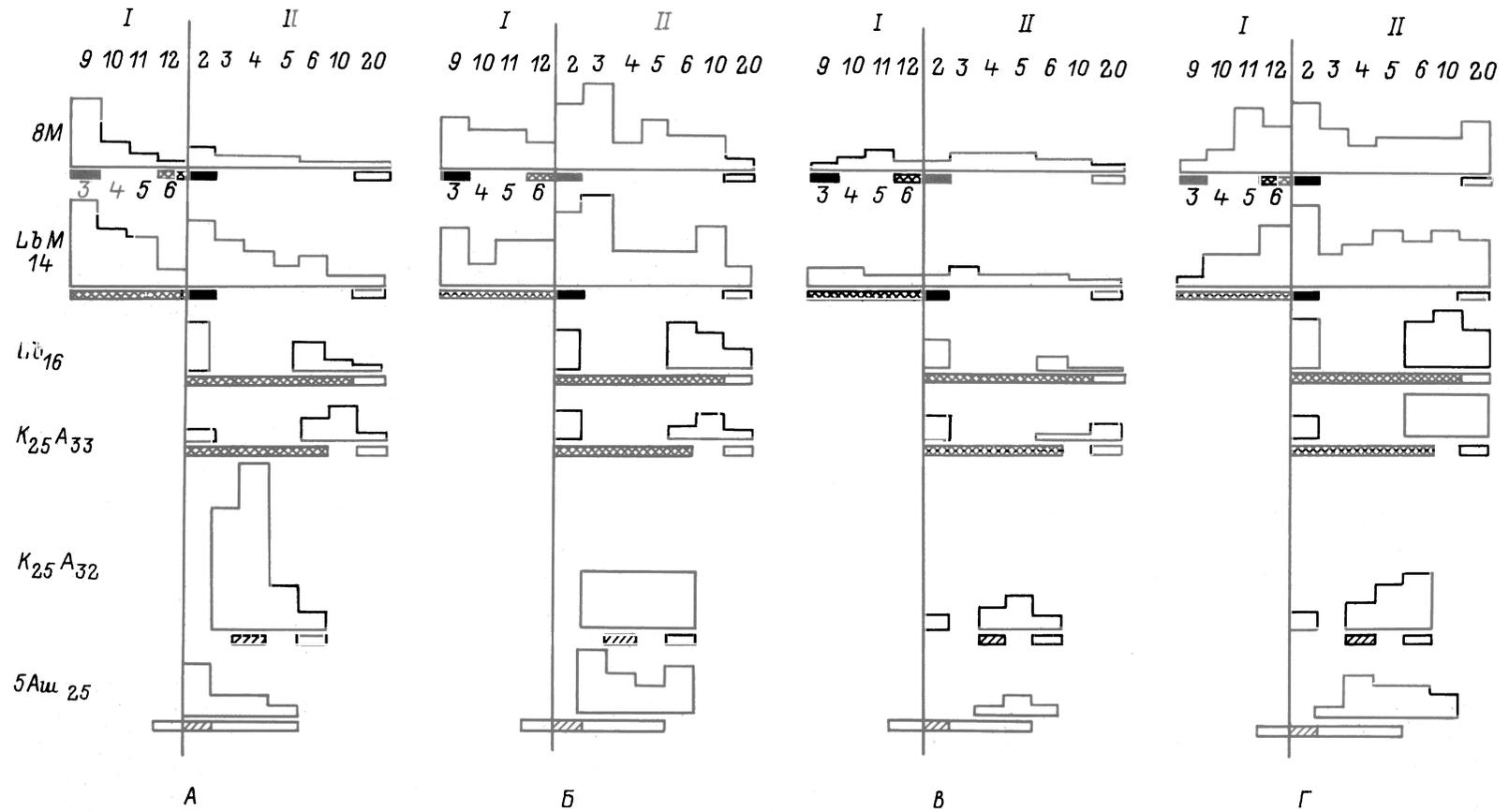
Активность НАДФ-Н-диафоразы была неодинаковой в разных морфотипах промастигот *L. tropica* и *L. braziliensis*, как и у ранее изученной *L. major*: максимальной (10—15 гранул формазана в клетке) в темных и светлых формах и минимальной (три гранулы) в просветляющихся и метациклических. Продукты реакции локализуются вокруг кинетопласта и ядра.

Как вирулентность и метациклогенез, диафоразная активность промастигот снижалась по мере культивирования (будь оно до или после пассажа на животных) с 8—10 до 2—8 гранул в клетке от 2-го к 10—20-му пассажирам (см. рисунок, Б). У части штаммов, в том числе и у долго остававшихся на одном среднем уровне вирулентности, диафоразная активность изменялась незначительно. Два субштамма, прошедшие пассаж в мышах, одновременно с вирулентностью и метациклогенезом заметно повысили и свою диафоразную активность (до 11—19 гранул в клетке), сниженную предварительным культивированием (до заражения мышей) (5—8 гранул). Они начинали новый рост в культуре с особенно высокого уровня этой активности, что совпадало с максимальной вирулентностью, и ее дальнейшее снижение было особенно заметным (как и вирулентности).

Пероксидазная активность у всех исследованных субштаммов была невысокой. Она почти не повышалась после пассажа лейшманий на мышах, а по мере культивирования снижалась еще больше и на 10—20-м пассажах часто не обнаруживалась вовсе. В начале культивирования несколько более активными были субштаммы, долго сохранявшие средний уровень вирулентности (см. рисунок, В).

Как и у ранее изученной *L. major*, янус-окисляющая активность у *L. tropica* и *L. braziliensis* выявлялась в виде темно-зеленых гранул, главным образом вокруг кинетопласта, ядра и между ними. Эта активность минимальна у метациклических форм.

В процессе культивирования лейшмании постепенно наращивают способность окислять янус зеленый. Наиболее очевидным и быстрым этот процесс



был у двух субштаммов, исследованных до введения их мышам (см. рисунок, Г). После выделения всех субштаммов из животных в культуру янус-окисляющая активность их была различной и ее уровень в начале культивирования положительно коррелировал со степенью вирулентности. Высоковирулентные субштаммы 8М и 1в<sub>14</sub>М начинали пребывание в культуре с высокой янус-окисляющей активности, средневирулентные 1в<sub>16</sub> и К<sub>25</sub>А<sub>33</sub> со средней, а наименее вирулентные К<sub>22</sub>А<sub>32</sub> и 5Аш<sub>25</sub> с низкой. Длительно остававшиеся средневирулентными субштаммы мало изменяли эту активность от пассажа к пассажи.

Наконец, культуры субштаммов 8М и 1в<sub>14</sub>М, повысившие свою вирулентность в результате пассажа на мышам, сохранили достигнутый в предшествующем культивировании уровень янус-окисляющей активности или даже несколько превзошли его.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование подтверждает, что падение вирулентности лейшманий в культуре, будь то штаммы, выделенные от человека или животных, коррелирует со снижением НАДФ-Н-диафоразной, пероксидазной активности промастигот и их способности трансформироваться в метациклические формы.

Эта зависимость наиболее очевидна, если паразиты попадают в культуру непосредственно от больного человека, и она тем менее четко выражена, чем сложнее история лабораторного содержания штамма, отделяющая его пребывание в человеке от выделения в культуру.

Если эти наблюдения за падением вирулентности лейшманий подтвердили результаты прежних работ, то восстановление или повышение вирулентности в связи с морфогенезом и изменением активности ряда ферментов промастигот исследовано впервые.

Следует заметить, что, во-первых, пассирование на мышам приводило к большему повышению вирулентности, чем пассирование на хомяках. Это можно объяснить большей чувствительностью последних к заражению лейшманиями и потому менее строгим отбором в них высоковирулентных особей. Во-вторых, восстановление вирулентности в результате заражения животных было временным и по мере культивирования выделенных из животных лейшманий она снова снижалась.

Выяснено, что восстановление или повышение вирулентности лейшманий сопровождается той или иной степенью восстановления полного морфогенеза (образования метациклических форм), стимуляцией активности НАДФ-Н-диафоразы, отчасти янус-окисляющих ферментов и пероксидазы в популяции промастигот.

Таким образом, исследование лейшманий как в процессе культивирования, так и в результате пассирования на животных показало, что снижение вирулентности в первом случае и повышение во втором сопровождаются изменением одних и тех же свойств промастигот: соответственно снижением и повышением активности ряда окислительно-восстановительных ферментов промастигот и их способности трансформироваться в финальные инвазивные метациклические формы.

---

Вирулентность, метациклогенез и окислительные ферменты лейшманий на разных этапах культивирования.

А — метациклогенез (% метациклических промастигот); Б — активность НАДФ-Н-диафоразы; В — активность пероксидазы; Г — янус-окисляющая активность (везде среднее число гранул-продуктов реакции — на клетку); вирулентность: 1 — высокая, 2 — средняя, 3 — низкая, 4 — отсутствует, I — до пассажа на животных, II — после пассажа на животных. Числа над гистограммой — номера пассажей (до и после пребывания в животных) а слева — обозначения субштаммов.

Virulence, metacyclogenesis and oxidative enzymes of leishmania on different stages of cultivation.

Т а б л и ц а 2  
Активность некоторых окислительных ферментов лейшманий в культурах  
разной вирулентности  
Activity of some oxidative enzymes of leishmania in cultures with different virulence

Фермент	Вид	Штамм	Вирулентность			
			высокая	средняя	низкая	отсутствует
НАДФ-Н-диафороза	<i>L. major</i>	17 *	4—15 <i>n</i> =22 M=8	3—8 <i>n</i> =16 M=4	2—10 <i>n</i> =8 M=4	1—5 <i>n</i> =6 M=3
	Тот же	8	9, 12	5		2
	»	5АШ <sub>25</sub>				8
	<i>L. tropica</i>	К <sub>25</sub> А <sub>32</sub>			8	8
	Тот же	К <sub>25</sub> А <sub>33</sub>		4		2
	<i>L. braziliensis</i>	1В <sub>14</sub> М	13	7		3
	Тот же	1В <sub>16</sub>		7		4
Пероксидаза	<i>L. major</i>	17 *	4—15 <i>n</i> =25 M=9	3—8 <i>n</i> =20 M=5	2—10 <i>n</i> =9 M=5	1—8 <i>n</i> =12 M=4
	Тот же	8	0—7 <i>n</i> =22 M=3	1—3 <i>n</i> =16 M=2	0.5—3 <i>n</i> =8 M=1	0.5—1 <i>n</i> =6 M=1
	»	5АШ <sub>25</sub>	2	1		1
	<i>L. tropica</i>	К <sub>25</sub> А <sub>32</sub>				3
	»	К <sub>25</sub> А <sub>33</sub>		1		2
	<i>L. braziliensis</i>	1В <sub>14</sub> М	2	2		1
	Тот же	1В <sub>16</sub>		3	1	1
Окисление януса зеленого Б	<i>L. major</i>	17 *	0—7 <i>n</i> =24 M=3	1—3 <i>n</i> =20 M=2	0.5—3 <i>n</i> =9 M=1	0.5—3 <i>n</i> =12 M=1
	Тот же	8	2—9 <i>n</i> =22 M=6	4—13 <i>n</i> =16 M=8	6—12 <i>n</i> =8 M=8	6—12 <i>n</i> =6 M=10
	»	5АШ <sub>25</sub>	7	8		9
	<i>L. tropica</i>	К <sub>25</sub> А <sub>32</sub>			5	5
	Тот же	К <sub>25</sub> А <sub>33</sub>		6		9
	<i>L. braziliensis</i>	1В <sub>14</sub> М	13	7		8
	Тот же	1В <sub>16</sub>		8		10
			2—13 <i>n</i> =24 M=6	4—13 <i>n</i> =20 M=8	5—12 <i>n</i> =9 M=8	5—12 <i>n</i> =12 M=9

Примечание. \* Суммарные данные о 17 изученных ранее штаммах (Насырова и др., 1993).

Отдельные непринципиальные различия между исследованными субштаммами не удается связать с их видовой принадлежностью. Поэтому найденную корреляцию вирулентности с метациклогенозом и окислительными ферментами промастигот можно рассматривать как общее свойство по крайней мере трех таких не очень близких видов лейшманий, как *L. major*, *L. tropica* и *L. braziliensis*.

Таким образом, для высоковирулентных культур характерны высокая диафоразная, пероксидазная и умеренная янус-окисляющая активность. В авирулентном состоянии, наоборот, начинает преобладать способность

окислять янус зеленый и значительно снижается активность диафоразы и пероксидазы. Культуры, обладающие средней и низкой вирулентностью, мало различаются между собой, проявляя умеренную активность названных ферментов (табл. 2).

Найденные корреляты вирулентности лейшманий подтверждают, что для ее сохранения важны не только продукция инвазивных метациклических, но и свойства всей популяции предшествующих им морфотипов промастигот, и прежде всего их окислительные возможности. Видимо, вирулентность лейшманий связана не только с определенной изоформой глюкозо-6-фосфат-изомеразы, пептидазой (Dogan, Herman, 1981), кислой фосфатазой (Katakura, Kobayashi, 1988), гликопротеиновой металл-протеазой (Wilson e. a., 1989; Chang, 1989), но и с окислительными ферментами такого разного назначения, как диафоразы и пероксидаза. При этом подтверждаются прежние наблюдения (Каллиникова и др., 1992) о том, что для сохранения вирулентности важны не только абсолютные показатели активности этих ферментов и метациклогенеза промастигот, но и постепенность их изменений.

Наиболее понятной может быть роль пероксидазы как фермента, обеспечивающего нечувствительность лейшманий к токсическому действию  $H_2O_2$  макрофагов и тем самым облегчающего взаимодействие паразита с этими клетками хозяина. Данные о том, что после выделения амастиготных форм в культуру чувствительность паразитов к  $H_2O_2$  начинает постепенно нарастать и это может быть связано со снижением вирулентности (Chanon, Blackwell, 1985a, 1985b), не только подтверждаются, но и получают объяснение: по мере культивирования снижается пероксидазная активность промастигот, с которой, видимо, и связана способность противостоять макрофагам. Этому представлению о роли пероксидазы в вирулентности лейшманий не соответствует, однако, отсутствие данного фермента именно у инвазивных метациклических форм.

Давно обнаруженная у лейшманий способность окислять янус зеленый Б (Sen Gupta e. a., 1953; Guha e. a., 1956) рассматривалась как маркер общей митохондриальной активности. С какими бы конкретными ферментами она ни связывалась теперь, эта окислительная деятельность оказалась важной не только для аттенуирования лейшманий в культуре, но и, как уже отмечалось ранее, для вирулентности (Каллиникова, Насыров, 1972). С вирулентностью и длительностью ее сохранения положительно коррелирует уровень янус-окислительной активности в самом начале культивирования, а также постепенность изменения этого уровня. Это показывает, как далеко во времени простирается зависимость вирулентности лейшманий от активности ферментов промастигот. В дальнейшем эта активность коррелирует с вирулентностью отрицательно. Ее изменения противоположны таковым диафоразы. Оба фермента характеризуют разные стороны митохондриальной деятельности и с вирулентностью лейшманий все же более непосредственно связана диафораза.

#### Список литературы

- Емельянова Л. П., Сафьянова В. М. Изучение антигенных свойств и вирулентности клонов лейшманий (Trypanosomatidae, Leishmania) // Паразитология. 1982. Т. 16, вып. 6. С. 445—450.
- Каллиникова В. Д., Насыров Ф. Ш. Цитохимическое изучение *Leishmania tropica* major в культуре // Цитология. 1972. Т. 14, № 2. С. 219—226.
- Каллиникова В. Д., Насырова Р. М., Насыров Ф. Ш., Сафьянова В. М. (Kallnikova V. D., Nasyrova R. M., Nasyrov F. Sh., Safjanova V. M.) Morphogenesis and Virulence of *Leishmania major* in the Process of Long-Term Cultivation // Arch. Protistenk. 1992. Bd 141. S. 327—334.
- Келлина О. И. Патогенность и вирулентность лейшманий // Сб. Протозоология. Вып. 7. Л.: Наука, 1982. С. 110—150.

- Насыров Ф. Ш., Насырова Р. М. (Nasyrov F. Sh., Nasyrova R. M.) Morphological and cytochemical characteristics of different stages of *Leishmania* development in culture // Progr. and Astr. V Europ. Multicoll. of Parasitol. Budapest. 4—9 Sept. 1988.
- Насырова Р. М., Насыров Ф. Ш. Морфологическая характеристика *L. major* на разных стадиях развития в культуре // Соврем. пробл. протозоол. Тез. докл. IV съезда ВОПР. Л.: Наука, 1987. С. 217.
- Насырова Р. М., Насыров Ф. Ш. Цитохимические изменения лейшманий при длительном культивировании // Цитология. 1992. Т. 34, № 4. С. 105.
- Насырова Р. М., Каллиникова В. Д., Насыров Ф. Ш., Сафьянова В. М. Изменения морфогенеза лейшманий в процессе длительного культивирования // ДАН СССР. 1988. Т. 301, № 1. С. 213—217.
- Chang K. P. Molecular determinants of *Leishmania* virulence // VIII Intern. Congr. of Protozool. July 10—17, 1989. Tsukuba, Japan. Progr. and Abstr. P. 59.
- Chanon J. J., Blackwell J. M. A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxidase. 1. Differences in sensitivity correlate with parasite-mediated removal of hydrogen peroxide // Parasitology. 1985a. Vol. 91, N 2. P. 197—206.
- Chanon J. J., Blackwell J. M. A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. 2. Possible mechanisms involved in protective H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging // Parasitol. 1985b. Vol. 91, N 2. P. 207—217.
- Doran T. I., Herman R. Characterization of Populations of Promastigotes of *Leishmania donovani* // J. Protozool. 1981. Vol. 28, N 3. P. 345—350.
- Guha A., Pyne C. K., Sen Gupta B. B. Cytochemical studies of mitochondria in leptomonad form of *Leishmania donovani*, the kala-azar parasite // J. Histochem. and Cytochem. 1956. Vol. 4, N 3. P. 212—216.
- Katakura K., Kobayashi A. Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania donovani* promastigotes // Infect. and Immunol. 1988. Vol. 56, N 1. P. 2856—2860.
- Sen Gupta P. C., Bhattacharjee B., Ray H. N. The cytology of *Leishmania donovani* (Laveran a. Mesnil, 1903) Ross, 1903 // Ind. Med. Assoc. 1953. Vol. 22, N 8. P. 305—308.
- Wilson M. E., Hardin K. K., Donelson J. E. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani* shagasi in virulent and attenuated promastigotes // J. Immunol. 1989. Vol. 143, N 2. P. 678—684.

Самаркандский медицинский институт  
им. И. П. Павлова, НИИ медицинской  
паразитологии им. Л. М. Исаева, Узбекистан;  
МГУ им. Ломоносова, НИИ  
микробиологии и эпидемиологии  
им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Поступила 25.07.1989  
После доработки 23.09.1992

#### VIRULENCE, METACYCLOGENESIS AND OXIDATIVE ENZYMES OF LEISHMANIA ISOLATED FROM ANIMALS IN CULTURE

F. Sh. Nasyrov, R. M. Nasyrova, V. D. Kallinikova, V. M. Safyanova

*Key words:* *Leishmania*, cultivation, morphogenesis, cytochemistry, virulence

#### S U M M A R Y

It has been shown that an increase of virulence of *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. braziliensis* as a result of passing through animals and its decrease during the cultivation are accompanied by certain changes of biochemical characteristics of these promastigotes. In the former case the activity of NADP-H-diaphorase and peroxidase of promastigotes and their ability to be transformed into final (invasional) metacyclic forms increase and in the latter case these characteristics decrease.

The level and duration of virulence in culture depend not only on absolute value of the above-mentioned characteristics but also on the graduality of their change.

Metacyclogenesis and activity of oxidative enzymes are suggested to be the correlates of virulence of various *Leishmania* species.