

# Deficiência de factor C3 – um caso clínico

## *C3 Deficiency – a case report*

Rev Port Imunoalergologia 2006; 14 (2): 149-155

Pedro Martins, Ângela Gaspar, José Rosado Pinto

Serviço de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia, Lisboa

### RESUMO

O sistema do complemento é um componente essencial do sistema imunitário inato, pelo que as deficiências de proteínas da sua complexa cascata podem ter consequências mais ou menos graves, de acordo com a importância do factor afectado. As complicações mais usuais das deficiências do complemento são infecções recorrentes a bactérias encapsuladas e distúrbios autoimunes. Os autores apresentam um caso clínico de deficiência do factor C3, situação extremamente rara, discutindo a fisiopatologia, apresentação clínica, investigação laboratorial e abordagem terapêutica.

**Palavras-chave:** complemento, C3, imunodeficiência primária.

### ABSTRACT

*The complement pathway plays a very important role on the innate immune system and that is why any complement deficiency could have serious consequences for the patient, mainly recurrent infections by encapsulated bacteria and autoimmune diseases. On the present paper the authors present a rare C3 deficiency case report, and discuss the pathophysiology, clinical presentation, laboratorial investigation and therapeutic approach.*

**Key-words:** complement, C3, primary immunodeficiency.

## INTRODUÇÃO

O sistema do complemento é um conjunto de mais de 30 proteínas diferentes, produzidas essencialmente no fígado e libertadas na circulação sanguínea sob a sua forma inactiva. Estas proteínas quando activadas fazem-no em cascata, desencadeando uma série de reacções complexas com o intuito de defender o organismo do eventual “agressor” que despoleitou toda a sequência do complemento. Trata-se de um sistema de defesa tão complexo como antigo, com centenas de milhões de anos, observado em seres tão primitivos como os ouriços-do-mar. No homem, as proteínas do complemento começam a ser produzidas durante o primeiro trimestre do desenvolvimento fetal, o que corrobora o papel primordial que este sistema tem na defesa do organismo<sup>1</sup>.

O complemento pode ser activado por três vias: a via clássica (assim designada por ser a primeira descoberta há mais de 100 anos atrás, apesar de filogeneticamente ser mais recente), a via alternativa e a via da lectina de ligação à manose (MBL). Os intervenientes da via clássica são designados pela letra “C” maiúscula, seguida de um número de 1 a 9. Às proteínas resultantes da clivagem destes factores é adicionada uma letra minúscula (ex. C2a) e às proteínas inactivadas é adicionado a letra i (ex. iC3b). As proteínas específicas da via alternativa são designadas por properdina, factor B e factor D e as da via da MBL são designadas por MBL, MASP-1 e MASP-2. Independentemente da via pela qual é activado, o objectivo final é o mesmo: o controlo da infecção<sup>2,3,4</sup>.

O complemento constitui de facto um elemento fundamental da imunidade inata ao destruir o invasor e ao alertar os outros efectores do sistema imunológico. Será fácil entender que qualquer doença que interfira quantitativamente ou qualitativamente na produção de uma das proteínas da cascata poderá ter consequências sérias na saúde do indivíduo afectado. Quanto maior a importância da proteína comprometida na cascata do complemento, maior gravidade terá a doença.

Neste trabalho é apresentado o caso clínico de uma criança do sexo masculino, de 13 anos de idade, com infecções bacterianas graves desde o primeiro ano de vida. As investigações efectuadas revelaram tratar-se de uma deficiência do factor C3 do complemento.

## CASO CLÍNICO

Trata-se de uma criança de 13 anos de idade, do sexo masculino, de etnia cigana, natural e residente em Lisboa, que foi referenciada ao Serviço de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia em Março de 2005 por quadro de infecções recorrentes graves.

Aparentemente saudável até aos 2 meses de idade, altura em que iniciou quadro de febre, tosse produtiva e sibilância, tendo sido internado por pneumonia durante um mês. Aos 2 anos, por quadro de febre, rinorreia purulenta, tosse produtiva e edema e eritema da região periorbitária direita, foi internado com o diagnóstico de sinusite aguda complicada com celulite periorbitária. Ainda aos 2 anos de idade, a mãe refere novo episódio febril, com vômitos persistentes, recusa alimentar e gemido que motivaram internamento com o diagnóstico de meningite pneumocócica. Seis meses mais tarde ocorreu novo internamento por meningite pneumocócica. Aos 3 anos, por quadro de febre associada a dor intensa, edema e eritema do 5.º dedo do pé esquerdo, foi internado com diagnóstico de osteomielite. Aos 6 anos teve mais 3 internamentos, com os diagnósticos de meningite pneumocócica, sinusite etmoido-maxilar e otomastoidite. Aos 7 anos, ocorreu novo quadro de pneumonia. A partir desta idade as principais complicações infecciosas foram do foro otorrinolaringológico, algumas com necessidade de internamento, nomeadamente aos 11 e aos 13 anos por pansinusite aguda, no último episódio acompanhada por celulite periorbitária. Refira-se que para além dos quadros infecciosos graves descritos, o doente sofreu múltiplos episódios de otite média aguda e amigdalite que motivaram adenoidectomia aos 2 anos e amigdalectomia aos 11 anos.

A criança nunca apresentou infecções mucocutâneas recorrentes, abscessos viscerais, queixas compatíveis com candidíase mucocutânea, infecções virais (vírus Varicela-Zoster, citomegalovírus, vírus Epstein-Barr), parasitárias recorrentes ou queixas compatíveis com tuberculose pulmonar ou de outra localização.

À observação a criança apresentava bom estado geral e de nutrição, com um bom desenvolvimento estaturponderal. Destaca-se do exame objectivo a existência de placas de timpanoesclerose bilaterais, com o restante exame sem alterações significativas.

Nos antecedentes familiares há a referir a existência de consanguinidade dos pais (primos em 1.º grau), sendo ambos saudáveis. Um dos três irmãos apresenta uma insuficiência renal crónica (por refluxo vesico-ureteral), sendo os outros dois saudáveis. Desconhecem-se antecedentes familiares alérgicos ou doenças de carácter heredo-familiar, nomeadamente patologia cardíaca, hematológica ou neurológica.

Perante este doente com história de múltiplos episódios infecciosos recorrentes desde os 2 meses de idade, na sua maioria graves, com necessidade de internamento hospitalar, foi colocada a hipótese de se tratar de uma imunodeficiência primária. Para o esclarecimento desta hipótese e avaliação da sua repercussão no doente, foram solicitados os seguintes exames, nomeadamente: hemograma, velocidade de sedimentação, estudo da coagulação sanguínea, da função renal e hepática, glicemia, doseamentos de imunoglobulinas séricas IgG e subclasses de IgG, IgA, IgM e IgE total, doseamento de anticorpos específicos (polissacáridos pneumocócicos e de *Haemophilus influenzae*), actividade hemolítica total do complemento (via clássica – CH100), doseamento de factores do complemento específicos (C3, C3a, iC3b, C4, C5, C6, C7, C8, C9, factor Bb), citometria de fluxo para estudo das populações linfocitárias (T, B e NK) e da activação linfocitária, doseamento de Ac. anti-nucleares, urina tipo II, teleradiografia de tórax, tomografia axial computadorizada dos seios peri-nasais e pletismografia corporal. O estudo da via alternativa – AH100 – e dos Ac. anti-me-

ningocócicos não foram efectuados por não se encontrarem disponíveis nos laboratórios onde a criança efectuou as análises sanguíneas.

Os resultados dos exames efectuados foram os seguintes: hemograma, velocidade de sedimentação, estudo da coagulação sanguínea, da função renal e hepática, glicemia, urina tipo II, IgM, IgG I, IgG2, IgG3, IgE total, C4, iC3b, factor Bb sem alterações. A pesquisa de auto-anticorpos foi negativa. O estudo da imunidade celular revelou-se sem alterações. A teleradiografia do tórax e a pletismografia corporal não apresentaram alterações significativas.

Em termos de alterações analíticas destacam-se CH100 e C3 não doseáveis, C3a de 32ng/dl (VR: 1200-2450), C5 de 16mg/dl (VR: 11,4-15,0), C6 de 1,9mg/dl (VR: 4,5-9,6), C7 de 12,5mg/dl (VR: 4,9-7,0), C8 de 18,9mg/dl (VR: 11,2-17,2), C9 de 27,5mg/dl (VR: 12,5-26,5), IgG total de 7,68g/l (VR: 8,0-17,0), IgG2 de 1,31g/l (VR: 1,4-4,4), IgG4 não doseável, Ac. anti-*Streptococcus pneumoniae* IgG e IgM e Ac. anti-*Haemophilus influenzae* IgG e IgM negativos. Estes resultados laboratoriais foram confirmados. A tomografia axial computadorizada dos seios peri-nasais efectuada após o último internamento (Maio de 2005), revelou reperiabilização da maioria das cavidades peri-nasais face a exames anteriores, mantendo no entanto a nível fronto-etmoidal opacificação significativa.

Foram efectuados doseamentos de C3, C4 e CH100 no pai, mãe e nos três irmãos, encontrando-se uma diminuição ligeira de C3 no pai e nos três irmãos, sendo normal o valor da mãe. Todos são assintomáticos.

Perante a história clínica sugestiva e os resultados dos exames efectuados, foi atribuído o diagnóstico de imunodeficiência primária com défice do factor do complemento C3.

Relativamente ao tratamento, o doente iniciou profilaxia com cotrimoxazol 960mg/dia, e tratamento empírico precoce de todas as agudizações infecciosas, com eventual recurso a perfusão de plasma fresco congelado em caso de infecção grave. Administrou-se vacina não conjugada pneumocócica polivalente de 23 serotipos, vacina meningocócica e do *Haemophilus influenzae* tipo b. Foi instituí-

da imunestimulação anti-infecciosa inespecífica em dois ciclos trimestrais/ano, que poderá favorecer a resposta inata e adaptativa, nomeadamente ao nível da mucosa respiratória e gastrointestinal. O doente é regularmente observado em consulta de Imunoalergologia, onde são avaliadas não só as complicações infecciosas, mas também as queixas sugestivas de patologia autoimune, mantendo o seguimento concomitante em consulta de Pediatria / Nefrologia, e em consulta de Genética.

## DISCUSSÃO

Excluindo a deficiência de C1 inactivador, as deficiências do complemento são pouco frequentes, calculando-se que correspondam a cerca de 2% de todas as imunodeficiências primárias, apesar desta estimativa ter como base os casos reportados. Podem ser adquiridas (mais frequentes, secundárias a processos infecciosos graves ou a doenças de foro autoimune) ou hereditárias. Relativamente a estas últimas, são raras, apresentando uma frequência estimada de 0,03% na população geral, sendo as deficiências da via da manose e de C2 as mais comuns (frequência entre 1:100 e 1:10 000 na população geral, podendo alcançar os 1% em doentes com lúpus eritematoso sistémico). O padrão de transmissão das deficiências de complemento pode ser autossómico recessivo, o mais frequente, ou autossómico dominante, como na deficiência de C1 inactivador, ou ainda relacionado com o cromossoma X, como na deficiência de properdina (necessária para a estabilização da C3 convertase da via alternativa – C3bBb). No entanto, apesar deste último exemplo, de um modo geral não existe predomínio do sexo afectado nas deficiências do complemento. Poderá existir um predomínio na raça caucasiana para algumas, como no caso da deficiência de C2<sup>5</sup>.

Em termos teóricos poderão existir deficiências totais para todos os factores do complemento. Os genes que codificam as diferentes proteínas, encontram-se distribuídos pelos vários cromossomas, nomeadamente o cromossoma 1 que contém os genes para C1q, o cromossoma 6

os genes para C2, C4A e C4B e o cromossoma 19 que contém o gene para C3.

Desde há cerca de 30 anos que foram reportados os primeiros casos de deficiências do complemento em humanos, em doentes com quadros infecciosos bacterianos graves e em doentes com patologia de foro autoimune<sup>6,7</sup>.

A idade do início dos sintomas é variável, podendo surgir quadros infecciosos a partir do terceiro mês, à medida que os anticorpos transplacentários decrescem. Por esta altura o sistema de complemento deverá em indivíduos normais, protegê-los dos agentes infecciosos encapsulados mediante o seu poder bactericida.

É importante diferenciar os principais tipos de défice de factores do complemento: 1) défice de componentes da via inicial clássica (C1q, C1r, C1s, C2 e C4), 2) défice de factores da via alternativa (factores B, D, H, I e properdina) e 3) defeitos da via final comum (C5-C9). A deficiência de C3, pela sua gravidade deve ser considerada à parte. Os defeitos da via clássica são os mais frequentes.

Embora em qualquer um dos tipos se verifique uma propensão aumentada para infecções, o défice de componentes da via inicial clássica encontra-se associado a uma menor susceptibilidade, dada a existência de vias alternativas, verificando-se no entanto uma grande prevalência de doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistémico (LES) e glomerulonefrites<sup>8</sup>. Isto deve-se não só ao facto dos factores iniciais da via clássica contribuírem para a *clearance* de imunocomplexos, mas também por desempenharem um importante papel na apoptose celular. Em caso de deficiência, ocorrerá uma ineficaz opsonização e fagocitose das células apoptóticas, aumentando a probabilidade destas funcionarem como autoantígenos. A deficiência de C1q apresenta a maior associação com o LES<sup>9, 10, 11</sup>.

Os défices da via alternativa são muito menos frequentes, podendo estar associados quer a infecções, quer à produção de auto-anticorpos.

O défice de factores da via final manifesta-se por uma frequência aumentada de infecções por agentes encapsulados, caracteristicamente a *Neisseria spp*, sendo curioso

que apesar da maior probabilidade de contrair a infecção, a probabilidade de morte é inferior, possivelmente por ocorrer uma menor lise bacteriana, com menor quantidade de endotoxinas libertadas<sup>12</sup>. A patologia autoimune nos defeitos da via final não é comum.

O défice de C3, sendo um componente crucial e central da cascata do complemento, apresenta características comuns aos da via inicial e final, com infecções semelhantes aos quadros de hipogamaglobulinemia (infecções frequentes por bactérias encapsuladas como o *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*), sendo também comum a associação de doença *lupus-like* e glomerulonefrite, nomeadamente nas formas secundárias<sup>13</sup>. É clivado pela C3 convertase da via clássica (C4b2a) e da alternativa (C3bBb), levando à formação de C3b, potente opsonina e ponto de partida para a formação do Complexo de Ataque da Membrana (MAC), canal cilíndrico transmembranário que leva à destruição do agente invasor, através de uma lise osmótica. Da activação do C3, resultam outros componentes com poder de opsonização e de quimiotaxia (ex. C3a). A deficiência de C3 pode ser secundária a uma deficiência dos factores I ou H, proteínas reguladoras que clivam o C3b em iC3b, que também tem capacidade de opsonização mas é incapaz de activar os componentes da via terminal. Pode também ser secundária à existência de anticorpos anti-C3<sup>5</sup>. Os defeitos da via MBL, ainda não referidos, encontram-se associados a doenças autoimunes, potenciando quadros infecciosos recorrentes durante a infância e em situações de imunodepressão<sup>4</sup>.

Perante uma história clínica sugestiva, deverá efectuar-se um estudo laboratorial do complemento. As investigações encontram-se habitualmente limitadas à avaliação da capacidade hemolítica, nomeadamente através do CHI00 e ao estudo do C3 e do C4, deficiências que apesar de raras são muitíssimo importantes. O CHI00 deve ser utilizado no *screening* de defeitos do complemento, nomeadamente dos da via clássica que são mais comuns. Pode encontrar-se diminuído caso exista deficiência de algum dos factores C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 ou C9. O

estudo da via alternativa pode ser efectuado através do AHI00, chamando-se a atenção de que poderá encontrar-se diminuído se houver deficiência não só dos factores D, B e P (properdina) mas também dos factores C3, C5, C6, C7, C8 ou C9. Os doseamentos das diferentes proteínas do complemento, tal como o estudo da função da via MBL, encontram-se de um modo geral consignados a laboratórios especializados. Do que foi dito, poderá concluir-se que atendendo aos factores do complemento envolvidos e à prevalência das diferentes deficiências do complemento, o CHI00 constitui o melhor teste de *screening* de defeitos do complemento<sup>14</sup>.

A deficiência hereditária de C3 é extremamente rara. Não é exclusiva do homem, tendo o primeiro caso sido descrito há mais de 30 anos<sup>6</sup>.

O diagnóstico final, do caso clínico apresentado, é o de imunodeficiência primária com défice do factor do complemento C3, apesar de também existir um valor baixo de C6. Refira-se que valores de C6 inferiores a 10% do normal são suficientes para manter a actividade lítica do soro<sup>15</sup>. O valor de iC3b do doente permite-nos excluir a existência de uma deficiência dos factores I e H, que poderão provocar uma diminuição de C3. Constatou-se também a existência de um défice de subclasses de IgG, nomeadamente de IgG2 e de IgG4, embora à luz do conhecimento actual esta situação, por si só, não justifique o quadro clínico descrito, podendo no entanto contribuir para o mesmo em associação ao défice de C3. Esta diminuição de IgG2 e IgG4 poderá ser consequência da deficiência de C3, dado que as deficiências da via clássica e de C3 parecem interferir no processo de produção de IgG. Tal facto é sugerido exactamente por se registarem concentrações baixas de IgG2 e IgG4 em doentes que sofrem deste tipo de doenças, o que poderá levar a uma maior susceptibilidade para agentes encapsulados, dado que a grande maioria dos anticorpos para polissacáridos pertencem a estas subclasses<sup>16</sup>.

O diagnóstico é suportado pelos níveis baixos da actividade hemolítica total do complemento (CHI00), associada a níveis infradoseáveis de C3 nos estudos efectuados.

A consanguinidade entre os pais e ausência de patologia semelhante nos familiares próximos (apesar da diminuição discreta encontrada no pai e nos três irmãos), sugerem existir um padrão de codominância. As características clínicas são igualmente sugestivas, já que os défices de factores do complemento associam-se a um risco aumentado de infecções graves por bactérias encapsuladas como foi já salientado.

O motivo pelo qual existe uma maior susceptibilidade a estas bactérias não é claro. Nas bactérias Gram-positivas, de um modo geral, a parede celular impede a lise mediada pelo complemento, sendo o seu papel essencialmente o de opsonizar. As bactérias Gram-negativas podem ser sensíveis à lise do complemento, pelo que para se tornarem invasivas necessitam de possuir mecanismos de defesa contra a opsonização e contra a lise. A cápsula de polissacáridos constitui um sistema defensivo anti-opsonização que impede o acesso das células fagocíticas ao C3b que se depositou subcapsularmente. No *Streptococcus pneumoniae* impede ainda a ligação da proteína C reactiva ao polissacárido C, que conduziria à activação da via clássica. A cápsula pode também ser protectora devido à própria composição, pelo que se for rica em ácido siálico, substância que promove a ligação do factor H ao C3b, não ocorre opsonização. Este é aliás um dos mecanismos de resistência da *Neisseria meningitidis*, pelo que um comprometimento da via terminal do complemento, essencial na lise desta Gram-negativa, pode resultar em doença invasiva<sup>15, 17, 18</sup>.

Para estas bactérias, a defesa do organismo passa pela produção de anticorpos anti-capsulares, sendo a protecção conferida pelo anticorpo em si e pela subsequente activação da via alternativa. Em modelos animais a deficiência de C3 impediu a opsonização através das vias clássicas e alternativa, mesmo na presença de anticorpos<sup>5</sup>.

O prognóstico de saúde nos doentes com deficiência de C3 depende em grande parte do início precoce do tratamento das complicações infecciosas e do desenvolvimento de eventuais resistências bacterianas.

O tratamento passará, tal como noutras situações de imunodeficiência primária, por profilaxia antibacteriana (tendo-se optado pelo cotrimoxazol) e pela vacinação. Relativamente à vacinação, actualmente não existe nenhuma estratégia universal. No entanto, é conhecido que a vacinação de doentes com deficiência de factores da via terminal com a vacina anti-meningocócica eleva o título de anticorpos para esta bactéria, apesar de não se saber até que ponto têm efeito protector. Estudos realizados demonstraram o aumento da capacidade fagocítica em doentes com defeitos da via terminal, após a administração da vacina anti-meningocócica<sup>19</sup>. Apesar do mecanismo pelo qual ocorre não se encontrar clarificado, pensa-se que resultará do efeito da interacção das imunoglobulinas com o factor C3.

O tratamento de eleição neste doente seria a reposição de C3, algo que não é possível dado não se encontrar disponível comercialmente. O plasma fresco congelado poderá constituir uma opção, nomeadamente como coadjuvante do tratamento com antibioterapia, em infecções graves.

Apesar da ausência até à data, de patologia autoimune, nomeadamente de queixas compatíveis e alterações laboratoriais sugestivas de LES ou de glomerulonefrite, o risco acrescido destas patologias obriga a uma avaliação regular.

#### **Agradecimentos:**

Dra. Emília Faria, Coordenadora do Grupo de Imunodeficiências Primárias da SPAIC.

Dra. Salomé Almeida, Serviço de Genética, Hospital de Dona Estefânia, Lisboa.

Dra. Esmeralda Neves, Serviço de Imunologia, Hospital de Santo António, Porto.

Prof. Doutor Anders Sjöholm, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário de Lund, Suécia.

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. The innate immune system. In: Sompayrac L. How the immune system works. 2nd edition, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing 2003; 15-25.

2. Walport MJ. Complement: first of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1058-66.
3. Walport MJ. Complement: second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1140-4.
4. The complement system and innate immunity. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology – the immune system in health and disease*. 6th edition, NY, USA: Churchill Livingstone 2005; 55-75.
5. Sjöholm AG, Jonsson G, Braconier JH, Sturfelt G, Truedsson L. Complement deficiency and disease: an update. *Mol Immunol* 2006; 43:78-85.
6. Alper CA, Colten HR, Rosen FS, Rabson AR, Macnab GM, Gear JS. Homozygous deficiency of C3 in a patient with repeated infectious. *Lancet* 1972; 2:1179-81.
7. Ballou M, Shira JE, Harden L, Yang SY, Day NK. Complete absence of the third component of complement in man. *J Clin Invest* 1975; 56:703-10.
8. Holers VM. Phenotypes of complement knockouts. *Immunopharmacol* 2000; 49:125-31.
9. Pickering MC, Walport MJ. Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2000; 39:133-41.
10. Trouw L, Roos A, Daha M. Autoantibodies to complement components. *Mol Immunol* 2001; 38:199-206.
11. Navratil JS, Korb LC, Ahearn JM. Systemic lupus erythematosus and complement deficiency: clues to a novel role for the classical complement pathway in the maintenance of immune tolerance. *Immunopharmacol* 1999; 42:47-52.
12. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:359-95.
13. Roord JJ, Daha M, Kuis W, Verbrugh HA, Verhoef J, Zegers BJ *et al*. Inherited deficiency of the third component of complement associated with recurrent pyogenic infections, circulating immune complexes, and vasculitis in a Dutch family. *Pediatrics* 1983; 71:81-7.
14. Leana W, Atkinson J, Giclas P. Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:585-93.
15. Würzner R. Deficiencies of the complement MAC II gene cluster (C6, C7, C9): is subtotal deficiency of particular evolutionary benefit. *Clin Exp Immunol* 2003; 133:156-9.
16. Bird P, Lachmann PJ. The regulation of IgG subclass production in man: low serum IgG4 I on inherited deficiencies of the classical pathway of C3 activation. *Eur J Immunol* 1988; 18:1217-22.
17. Marques MB, Kasper DL, Shroff A, Michon F, Jennings H, Wessels M. Functional activity of antibodies to the group B polysaccharide on Group B Streptococci elicited by a polysaccharide protein conjugate vaccine. *Infect Immun* 1994; 62:1593-9.
18. Mold C. Role of complement in host defense against bacterial infection. *Microbes and infection* 1999; 1:633-8.
19. Platanov AE, Vershinina IV, Kujiper EJ, Borrow R, Kayhty H. Long term effects of vaccination of patients deficient in a late complement component with a tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine. *Vaccine* 2003; 21:4437-47.