

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Registro Nazionale Malattie Rare:
malformazioni congenite e acido folico**

A cura di
Anna Pierini (a), Fabrizio Bianchi (a), Paolo Salerno (b) e Domenica Taruscio (b)

*(a) Istituto di Fisiologia Clinica, Sezione di Epidemiologia,
Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pisa*

*(b) Centro Nazionale Malattie Rare, Dipartimento Biologia Cellulare e Neuroscienze,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

06/34

Istituto Superiore di Sanità

Registro Nazionale Malattie Rare: malformazioni congenite e acido folico.

A cura di Anna Pierini, Fabrizio Bianchi, Paolo Salerno e Domenica Taruscio

2006, iv, 114 p. Rapporti ISTISAN 06/34

Si stima che nel nostro Paese circa il 3% dei nati siano affetti da malformazioni congenite. L'assunzione di acido folico prima del concepimento e nelle prime fasi della gravidanza ha un effetto preventivo riguardo ai difetti del tubo neurale, severe anomalie congenite determinate dalla mancata chiusura del tubo neurale che si completa nella terza-quarta settimana dal concepimento, e di altre malformazioni quali difetti cardiaci congeniti, anomalie congenite del tratto urinario, labio-palatoschisi, difetti in riduzione degli arti. In diversi Paesi, sono state realizzate iniziative di sanità pubblica con lo scopo di ridurre queste malformazioni attraverso un adeguato apporto di acido folico alle donne in età fertile. Il network italiano Promozione Acido Folico, costituitosi nel 2004 e al cui coordinamento collabora il Centro nazionale malattie rare dell'Istituto Superiore di Sanità, ha elaborato e diffuso una raccomandazione per la supplementazione peri-concezionale di acido folico: "Si raccomanda che le donne che programmano una gravidanza, o che non ne escludono attivamente la possibilità, assumano regolarmente almeno 0,4 mg al giorno di acido folico per ridurre il rischio di difetti congeniti. È fondamentale che l'assunzione inizi almeno un mese prima del concepimento e continui per tutto il primo trimestre di gravidanza". Questo lavoro fornisce una revisione delle evidenze scientifiche disponibili in letteratura sull'efficacia dell'acido folico nella prevenzione di difetti congeniti e possibili strategie di sanità pubblica.

Parole chiave: Acido folico, Malformazioni congenite, Malattie rare, Prevenzione

Istituto Superiore di Sanità

National register of rare diseases: congenital malformation and folic acid.

Edited by Anna Pierini, Fabrizio Bianchi, Paolo Salerno and Domenica Taruscio

2006, iv, 114 p. Rapporti ISTISAN 06/34 (in Italian)

It is estimated that in Italy at least 3% of babies are born with some congenital malformation. Scientific evidence demonstrates that the intake of folic acid by a woman prior the conception and during the early stages of pregnancy plays a role in preventing neural tube defects and severe birth anomalies due to the lack of neural tube closure at either the upper or lower end during the third and fourth week of pregnancy. The intake of folic acid during the periconception period can reduce the risk of other neonatal malformations such as congenital heart defects, urinary tract anomalies, oral facial clefts, limb defects. In several Countries, public health initiatives aiming at reducing congenital malformations through the promotion of folic acid intake in childbearing age woman have been carried out. The Italian network for Folic Acid Promotion, established in 2004 and coordinated by the National Centre for Rare Diseases of the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy), has elaborated and diffused the following recommendation for the periconceptional supplementation of folic acid: "In order to reduce the risk of congenital defects women that program a pregnancy or don't exclude this possibility are recommended to assume 0,4 mg/day of folic acid. The assumption of folic acid should start at least one month before the conception and should continue for the first three months of pregnancy". This article provides an overview of the available scientific evidence on the effect of folic acid in the prevention of congenital malformations and possible public health strategies.

Key words: Folic acid, Congenital malformation, Rare diseases, Prevention

Per informazioni su questo documento scrivere a: domenica.taruscio@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2006

INDICE

Glossario	iii
Acido folico e difetti congeniti: evidenze scientifiche e strategie di sanità pubblica	1
Bibliografia.....	7
Aspetti nutrizionali dei folati	11
Introduzione.....	11
I folati negli alimenti	11
Dalla cura delle anemie agli effetti sull'omocisteina	11
Metodi di determinazione, contenuti e forme.....	13
Biodisponibilità, bioaccessibilità e bioefficacia dei folati e il concetto di folati equivalenti.....	17
Livelli di ingestione media giornaliera di folati nella dieta italiana	20
Bibliografia	21
Livelli di assunzione raccomandati di folati	25
Considerazioni relative alle raccomandazioni dietetiche di folato	28
Carenza.....	28
Rischi di tossicità	30
Derivazione dei livelli massimi ammissibili	32
Caratterizzazione del rischio	33
Bibliografia.....	34
Strategie per aumentare l'apporto di folati nella dieta	36
Alimentazione con alimenti ricchi in folati	36
Supplementazione.....	37
Fortificazione.....	38
Bibliografia.....	39
Acido folico: nuovi aspetti nella valutazione rischio- benefico	41
Prevenzione dei difetti congeniti mediante acido folico e analisi del rischio in sicurezza alimentare.....	41
Recenti acquisizioni scientifiche di potenziale interesse per la valutazione rischio-beneficio dell'acido folico.....	42
Fortificazione della farina di frumento con acido folico.....	43
Valutazione dell'esposizione.....	43
Valutazione del rischio.....	44
Considerazioni conclusive	45
Bibliografia.....	46
Malformazioni congenite sensibili all'azione dell'acido folico: l'andamento del fenomeno in Italia	48
Introduzione.....	48
Registri dei difetti congeniti in Italia	50
Registro Nord-Est Italia (NEI)	51
Registro Emilia Romagna (IMER).....	52
Registro Toscano Difetti Congeniti (RTDC).....	52
Registro Campano Difetti Congeniti (RCDC).....	53
Indagine Siciliana Malformazioni Congenite (ISMAL).....	53

Materiali e metodi.....	54
Risultati dello studio.....	56
Prevalenze di base (<i>baseline</i>) totali (nati+IVG).....	56
Distribuzione per sesso.....	58
Distribuzione per tipo di evento.....	58
Distribuzione per tipo di manifestazione della MC.....	59
Distribuzione per peso ed età gestazionale nei nati e per età materna nei casi totali.....	60
Analisi delle prevalenze.....	61
Obiettivi, materiali e metodi.....	61
Risultati.....	61
Conclusioni.....	64
Bibliografia.....	65
Appendice A - Andamento delle prevalenze annuali delle MC.....	69
Appendice B - Distribuzione delle MC per tipo di manifestazione per ciascun Registro.....	81
Appendice C - Prevalenze totali e alla nascita delle MC.....	87
Appendice D - Andamento temporale, test di omogeneità, trend e linearità delle prevalenze delle MC selezionate negli RDC.....	95
Appendice E - Bibliografia prodotta dal ogni singolo RDC.....	107

Glossario

Anencefalia

Difetto congenito caratterizzato da assenza parziale o totale delle ossa della volta cranica e della corrispondente cute dello scalpo, con esposizione di tessuto cerebrale degenerato. L'encefalo può essere assente del tutto o può essere estremamente rudimentale e apparire come un bottone di tessuto fortemente vascolarizzato che contiene a volte neuroni, glia e plessi corioidei. Può essere distinta una forma completa (*olo-anencefalia*) in cui sono assenti tutte le strutture della volta cranica, e una forma parziale (*mero-anencefalia*) dove l'occipitale è presente con integrità del forame.

Spina bifida

Difetto congenito caratterizzato da protrusione o esposizione all'esterno, attraverso una mancata saldatura degli archi posteriori vertebrali, di tessuto midollare spinale e/o delle meningi. A volte tale formazione erniosa è ricoperta da cute o, più spesso da una esile membrana. Ai fini epidemiologici non viene considerata la *spina bifida occulta*.

In base alla sede si riconosce: *spina bifida cervicale*, *spina bifida toracica*, *spina bifida toracico-lombare*, *spina bifida lombare*, *spina bifida lombo sacrale*, *spina bifida sacrale*.

Encefalocele

Difetto congenito caratterizzato da protrusione attraverso soluzioni di continuità della volta cranica, di meningi e/o tessuto cerebrale.

In base alla sede si riconosce: *encefalocele mediano-anteriore* (naso-frontale), *encefalocele mediano-parietale* (al vertice), *encefalocele mediano-posteriore* (in sede occipitale), encefalocele laterale atipico.

Difetti tubo neurale

Comprendono *anencefalia*, *iniencefalia*, *craniorachischisi*, *spina bifida* ed *encefalocele*.

Iniencefalia

Difetto variabile a carico delle ossa occipitali con conseguente allargamento del foramen magnum associato a parziale o totale assenza delle vertebre cervicali e toraciche e con fusione irregolare di quelle presenti, con incompleta chiusura degli archi e/o dei corpi vertebrali, lordosi e iperestensione delle vertebre cervico-toraciche malformate.

Craniorachischisi

La craniorachischisi è un raro e complesso difetto di chiusura della linea mediana caratterizzato da acrania con anencefalia e schisi completa dell'intera colonna vertebrale.

Malformazioni cardiovascolari

Includono malformazioni del cuore, dei grossi vasi e dei vasi periferici.

Schisi orali

Comprendono *palatoschisi* e *labioschisi*. La *palatoschisi* è un difetto congenito caratterizzato dalla schisi a carico del palato duro e/o molle senza schisi del labbro. La *labioschisi con o senza palatoschisi* è un difetto congenito caratterizzato dalla schisi a carico del labbro superiore con o senza la schisi del processo alveolare mascellare e il palato duro o molle.

Difetti in riduzione degli arti

Difetti congeniti caratterizzati da assenza o severa ipoplasia delle strutture scheletriche.

In base alla sede del difetto si riconoscono:

– *Terminale trasverso*

assenza delle strutture distali dell'arto (o degli arti) con strutture prossimali più o meno normali.

- *Intercalare*
 assenza o severa ipoplasia delle strutture prossimali (omero e femore) e/o distali (radio e ulna o tibia e fibula) con mani e piedi normali o malformati. La presenza di strutture ossee distali distingue il difetto intercalare dal terminale trasverso.
- *Longitudinale*
 assenza o severa ipoplasia della parte laterale di un arto:
 - preassiale: sono considerate strutture preassiali il pollice, il primo metacarpo e il radio, o l'alluce, il primo metatarso e la tibia.
 - postassiale: sono considerate strutture postassiali il mignolo, il quinto metatarso e l'ulna, o il quinto metacarpo e la fibula.

Atresia/stenosi ano-rettale

Difetto congenito caratterizzato da assenza dell'ano o da comunicazione tra ano e retto o da stenosi serrata del canale anale, con o senza fistola con gli organi vicini. Il retto non si è sviluppato caudalmente e non si fonde con l'abbozzo anale. Esistono di conseguenza due tipi di malformazioni: a) le forme alte in cui il moncone rettale non ha contatti con il muscolo elevatore dell'ano; b) le forme basse in cui il retto è inserito correttamente nell'elevatore dell'ano ma non è presente la canalizzazione dell'ano e del retto.

Anomalie apparato urinario

Comprendono agenesia e disgenesia renale, rene cistico, difetti ostruttivi della pelvi renale e dell'uretere, altre anomalie specificate del rene, altre anomalie specificate uretere, estrofia di vescica o cloaca, difetti dell'uretra.

Onfalocele

Difetto congenito caratterizzato da erniazione del contenuto addominale attraverso l'anello ombelicale il cui rivestimento può rimanere integro o presentarsi lacerato. L'onfalocele deve quindi essere considerato come un difetto dell'ombelico. Il contenuto addominale erniato, ricoperto da una duplice membrana, peritoneo all'interno e membrana amniotica all'esterno, può essere costituito da una o più anse intestinali di solito malrotate, a volte atresiche, del fegato, milza, pancreas.

Le definizioni dei difetti congeniti presenti nel glossario sono state tratte dai seguenti testi e siti internet:

Buyse ML, *Birth Defects Encyclopedia*. Dover, MA: Center for Birth Defects Information Services, Inc; 1990.

Università di Padova, Dipartimento di pediatria, Osservatorio Regionale Veneto per la Patologia in età Pediatrica, Registro delle malattie rare. *Cosa sono le malattie rare*. Disponibile all'indirizzo: http://malattierare.pediatria.unipd.it/pagine_statiche/index.htm; ultima consultazione 22/11/2006.

International Clearinghouse for Birth Defect Monitoring System. *Annual report 2000 with data 1998*. Roma: International Centre of Birth Defect; 2000.

Mastroiacovo P, Dallapiccola B, Andria G, Camera G, Lungarotti MS. *Difetti congeniti e sindromi malformative*. Milano: McGraw-Hill; 1990.

Mazzera E. *Le cardiopatie congenite in età pediatrica*. Roma: Ospedale Pediatrico Bambino Gesù; Disponibile all'indirizzo: <http://www.opbg.net/sitoweb/cardio.nsf/>; ultima consultazione 22/11/2006.

Meli P, Spagnolo A, Gruppo dei Registri italiani sulle malformazioni congenite. *Sorveglianza delle malformazioni congenite in Italia (1986-1990). Revisione e standardizzazione delle metodologie di rilevamento e risultati dell'esperienza collaborativi con i Registri italiani*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1993. (Rapporti ISTISAN 93/39).

Telethon. *Informazioni sulle malattie genetiche e rare*. Comitato Telethon Fondazione Onlus. Disponibile all'indirizzo: http://www.telethon.it/informagene/lista_malattie.asp; ultima consultazione 22/11/2006.

ACIDO FOLICO E DIFETTI CONGENITI: EVIDENZE SCIENTIFICHE E STRATEGIE DI SANITÀ PUBBLICA

Domenica Taruscio, Paolo Salerno

Dipartimento Biologia Cellulare e Neuroscienze, Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le malformazioni congenite (MC) rappresentano nel nostro Paese un rilevante problema di sanità pubblica sia per la prevalenza, che si attesta secondo stime conservative intorno al 3% dei nati sia per le disabilità associate. In particolare, in Italia le MC rappresentano una quota rilevante sul totale delle cause di mortalità infantile.

Da dati del 2002 pubblicati dall'ISTAT sulle cause di morte nella fascia di età da 0 a 1 anno il tasso di mortalità relativo alle MC risulta di 1,2/10.000 su un totale di 4,1/10.000 relativo a tutte le cause di morte, attestandosi quindi su percentuali intorno al 30% del totale (1).

L'anencefalia, la spina bifida e l'encefalocele rappresentano le più frequenti manifestazioni dei Difetti del Tubo Neurale (DTN). Questi si determinano durante lo sviluppo embrionale e in particolare nel periodo a cui corrisponde la chiusura del tubo neurale, dal 17° al 30° giorno dal concepimento.

L'anencefalia è l'assenza completa o parziale della volta cranica e dei tessuti sovrastanti con vario grado di malformazione e distruzione degli abbozzi di cervello esposto. Per l'anencefalia sono riportate percentuali di nati vivi tra il 40 e il 60%, mentre dopo la nascita soltanto l'8% sopravvive più di una settimana e l'1 % tra uno e tre mesi. È riportato un caso singolo di sopravvivenza fino a 14 mesi (2). L'encefalocele, è condizione in cui una parte dell'encefalo, più o meno gravemente malformato, ernia da un difetto di chiusura del cranio. La terapia è chirurgica con riduzione del contenuto della sacca all'interno del cranio e plastica della breccia. L'intervento va attuato al più presto dopo la nascita e il danno è determinato dall'entità del danno neurologico eventualmente associato.

La Spina Bifida è determinata da un difetto di chiusura, per mancata fusione di uno o più archi vertebrali con eventuale protrusione di midollo e meningi. Se esiste solo una protrusione delle meningi si parla di meningocele. Se invece fuoriescono meningi e tessuto nervoso si tratta di mielomeningocele.

La gravità dei segni clinici varia considerevolmente in rapporto al livello e all'estensione della lesione, ma possono essere presenti paraplegia (arti inferiori), idrocefalo, malformazione di Arnold-Chiari (secondaria alla lesione della colonna vertebrale durante lo sviluppo fetale), incontinenza urinaria e ano-rettale, con la possibilità di esiti fortemente invalidanti.

Sono disponibili dati epidemiologici sui DTN raccolti a livello Europeo da EUROCAT (*European Surveillance of Congenital Anomalies*). Sulla base di questi dati si stima che ogni anno si determinano nella popolazione Europea circa 4500 casi di DTN tra nati vivi (NV), nati morti (NM) e interruzioni di gravidanza (IG). Inoltre, dati rilevati nei diversi Paesi europei indicano variazioni geografiche che oscillano da 16,05/10.000 rilevato nel Galles a 5,14/10.000 NV, NM, IG rilevato nella Toscana nel periodo 2000-2004 (3). Dati epidemiologici italiani, rilevati dal Registro Toscana Difetti Congeniti (RTDC), Registro Campania Difetti Congeniti (RCDC) e Registro del Nord Est Italia riferiti al periodo che va dal 1992 al 1999 indicano che per la spina bifida la prevalenza è di 3,3/10.000, l'anencefalia 2,6/10.000 e l'encefalocele 0,9/10.000 NV, NM, IG (4).

Folato è il termine generico per indicare composti vitaminici del gruppo B (vitamina B₉) che svolgono la loro funzione nel trasferimento di unità mono-carboniose nel metabolismo degli acidi

nucleici e aminoacidi.

L'acido folico (AF, acido pteroilmonoglutammico) è la forma più stabile e ossidata e rappresenta la forma introdotta negli alimenti fortificati e presente nei supplementi, mentre i folati alimentari sono pteroilpoliglutammati che contengono da 1 a 6 molecole di glutammato e che si presentano ridotti prevalentemente in posizione 5 e/o 10 dell'anello ptericoico (es. tetraidrofolato, 5 formiltetraidrofolato). La forma ossidata presenta una biodisponibilità doppia rispetto ai folati presenti negli alimenti e quindi assunti attraverso la dieta (5).

Le prime indicazioni relative ad un possibile ruolo dei folati nella salute riproduttiva non riguardano i DTN ma il trattamento dell'anemia megaloblastica insorta in gravidanza. Vengono infatti descritti nei primi anni 30' alcuni casi di successi terapeutici in pazienti con questa patologia trattati con estratti di lieviti (6).

Quasi 40 anni dopo, nel 1970, la *Food and Nutrition Board, National Research Council (USA)* ha prodotto delle raccomandazioni per l'uso dell'AF nella prevenzione dell'anemia megaloblastica in gravidanza (7).

Un possibile ruolo di deficienze vitaminiche nel determinismo di DTN è stato indagato da Smithells RW *et al.*(1970), che seguendo 900 gravidanze e determinando nel primo trimestre di gravidanza il folato sia sierico che eritrocitario ha evidenziato più bassi livelli di folato eritrocitario nel gruppo di casi (6 donne con gravidanza con esito DTN) rispetto ai controlli, con differenze statisticamente significative (8).

Negli anni '90 sono state prodotte numerose evidenze sul ruolo protettivo dell'AF assunto nel periodo peri-concezionale nei confronti dei DTN. I trials clinici elencati nella Tabella 1 sono stati presi in considerazione per la revisione sistematica dalla letteratura effettuata da Lumley *et al.* nel 2001 (9-13).

Tabella 1. Trial clinici sulla supplementazione di AF in periodo peri-concezionale

Autore e anno	Nazione	Breve descrizione e risultati
Laurence et al, 1981 (10)	Galles	4 mg/die per la prevenzione del rischio di ricorrenza 58 donne trattate 47 gruppo placebo placebo 0 casi di DTN nati da donne aderenti al trattamento 6 casi di DTN (2 trattate non aderenti e 4 nel gruppo placebo) Rischio relativo 0,43, IC 95% 0,08-2,23
MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11)	Inghilterra	4 mg/die per la prevenzione del rischio di ricorrenza 593 donne trattate. 602 nel gruppo placebo 6 casi DTN in donne aderenti al trattamento 21 casi di DTN nel gruppo placebo Rischio relativo 0,28, IC 95% 0,12-0,71
Kirke 1992 (12)	Irlanda	AF + Multivitaminico per la prevenzione del rischio di ricorrenza 169 donne trattate (AF+ multivitaminico) 88 placebo (multivitaminico) 0 casi di DTN trattamento 1 caso di DTN placebo Rischio relativo 0,17, IC 95% 0,01-4,24
Czeizel, 1994 (13)	Ungheria	0,8 mg per la prevenzione del rischio di occorrenza 2471 donne trattate con multivitaminico + folato 2391 placebo 0 casi di DTN donne in trattamento 6 casi di DTN gruppo placebo Rischio relativo 0,07 IC 95% 0,00-1,32

In questa revisione è stimato un rischio relativo complessivo riguardo ai DTN di 0,28 (95% IC 0,15-0,53), con un effetto protettivo quindi superiore al 70%.

La revisione sistematica ha preso in considerazione diversi esiti che sono sintetizzati in Tabella 2. Oltre ai trials clinici randomizzati, indicati nella revisione di Lumley e colleghi, altri studi, sono stati realizzati e hanno contribuito a definire il ruolo protettivo dei folati riguardo i DTN sia per ciò che riguarda l'occorrenza che la ricorrenza.

È da citare il trial clinico non randomizzato di Smithells *et al.*(14), il quale ha rilevato una differenza statisticamente significativa per ciò che riguarda il rischio di ricorrenza di DTN in donne che assumevano AF in multivitaminico (0,6%) rispetto al gruppo di controllo (5%).

Altri studi osservazionali hanno completato l'insieme delle evidenze a sostegno del ruolo protettivo dell'AF riguardo i DTN, e in particolare gli studi di Mulinare *et al.* (1988), Milunsky *et al.*(1989), Bower *et al.*(1989), Werler *et al.*(1993) e Berry *et al.*(1999) (15-19).

Solo lo studio di Mills *et al.*(1989) non ha evidenziato alcun effetto protettivo dell'AF riguardo i DTN (20).

La revisione della letteratura di Lumeley *et al.* indica un effetto, seppur non statisticamente significativo, su altri difetti congeniti (Tabella 2).

Tabella 2. Esiti valutati nella revisione sistematica della letteratura di Lumley e colleghi

Esiti	Studi considerati	Rischio relativo e IC 95%
DTN	Laurence, (10) MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	0,28 (95% IC 0,15-0,53)
Aborti	MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	1,12 (0,98-1,29)
Gravidanze ectopiche	MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	1,09 (0,47-2,55)
Nati morti	MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	0,78 (0,34-1,78)
Gemellarità	MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	1,40 (0,93-2,11)
Difetti in riduzione degli arti	MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	0,59 (0,04-8,30)
Difetti cardiaci	MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	0,74 (0,16-3,32)
Schisi oro-facciali	MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	0,76 (0,24-2,37)
Altri difetti congeniti	MRC Vitamin Study Research Group, 1991 (11) Kirke 1992 (12) Czeizel, 1994 (13)	0,76 (0,38-1,51)

Riguardo l'effetto sugli altri difetti congeniti sono da citare gli studi condotti su schisi oro-facciale (labiopalatoschisi, LPS e labioschisi, LS), difetti cardiaci, difetti del tratto genito-urinario e difetti in riduzione degli arti.

In particolare per le LPS si riporta lo studio prospettico non randomizzato di Tolarova *et al.*(1995) sul rischio di ricorrenza che ha evidenziato l'effetto protettivo di circa 2/3 (0,34 IC 95% 0,1-1,1) di alti livelli di AF (10 mg) (21) e lo studio caso-controllo di Itikala *et al.*(2001) che ha evidenziato un odds ratio (OR) di 0,52 (IC 95% 0,34-0,80) per le LPS e di 0,81 (IC 95% 0,44-1,52) per le PS tra le donne che avevano usato un multivitaminico contenente AF durante il periodo periconcezionale o nel primo mese di gravidanza.

Nessuna riduzione del rischio è stata rilevata tra le donne che avevano utilizzato il multivitaminico nel secondo o terzo mese di gravidanza (22).

Czeizel *et al.*(1999) in uno studio caso-controllo hanno evidenziato un effetto dose dipendente sia per le LPS che per le PS rilevando come dosi di AF superiori a 3 mg/die siano protettive (LPS=0,72 IC 95% 0,55-0,92; PS=0,75 IC95% 0,58-0,96) (23).

I dati prodotti da Hayes *et al.*(1996) non hanno evidenziato alcuna associazione tra uso di AF e rischio di tutti i tipi di schisi (24).

Per ciò che riguarda i difetti cardiaci, nello studio randomizzato ungherese è stata dimostrata una differenza significativa tra gruppo trattato con multivitaminici e placebo (25).

Dopo questo studio l'attenzione è stata posta in particolare sulle cardiopatie cono-troncali che come i DTN e le LPS sono difetti della linea mediana. Il lavoro di Botto *et al.* (2000) evidenzia che diversi studi hanno dato stime del rischio non sempre significative. Tuttavia si può ritenere che soprattutto per i difetti cardiaci interventricolari e cono-troncali l'assunzione periconcezionale di AF svolga un ruolo protettivo (26).

Sempre dallo studio randomizzato ungherese si evidenzia l'effetto protettivo dell'AF riguardo i difetti congeniti del tratto genito-urinario. In particolare, si osserva una riduzione del rischio del 78% con differenze statisticamente significative (0,22 IC95% 0,05-0,99) (25).

La riduzione significativa del rischio di difetti del tratto genito-urinario è stata rilevata anche nello studio caso-controllo di Li *et al.*(1995) (0,14 IC95% 0,05-0,41) (27).

Diversi studi caso-controllo hanno indagato sull'effetto protettivo dell'AF riguardo i difetti in riduzione degli arti.

In particolare, oltre allo studio clinico randomizzato ungherese (28) sono da citare gli studi caso controllo di Shaw *et al.*(1995) (29) e di Yang *et al.*(1997) (30) che hanno evidenziato una riduzione del rischio rispettivamente del 46% (0,64 IC 95% 0,41-1) e del 53% (0,47 IC 95% 0,23-0,97).

In conclusione, relativamente all'insieme dei difetti congeniti risulta opportuno citare oltre allo studio clinico randomizzato ungherese che ha rilevato per l'insieme dei difetti congeniti un rischio relativo di 0,54 (IC 95% 0,39-0,76) (13) lo studio più recente di Botto *et al.* che in uno studio caso-controllo hanno rilevato una riduzione statisticamente significativa del rischio del 20% (IC 95% 0,69-0,93).

Sulla base di questi ultimi dati e dall'analisi della letteratura gli autori hanno realizzato alcune stime relativamente al numero di difetti congeniti potenzialmente prevenibili giornalmente nel mondo attraverso l'uso di supplementi multivitaminici, con una stima che varia da 2100 a 5200 relativamente a tutti i difetti congeniti (31).

Le evidenze raccolte in questi ultimi anni hanno rivelato la necessità di incrementare l'assunzione di folati nelle donne che sono in età riproduttiva.

Le possibili strategie per raggiungere questo obiettivo sono le seguenti:

- incrementare l'assunzione di alimenti ricchi di folati;
- supplementazione di AF nel periodo periconcezionale;
- fortificazione degli alimenti AF.

Per una valutazione differenziale dell'efficacia delle tre diverse strategie è rilevante lo studio da McNulty *et al.*(1996) che ha valutato le modificazioni della concentrazione dei folati nei globuli rossi in risposta a un intervento nel quale le donne sono state assegnate a uno dei

seguenti gruppi: a) supplementazione 0,4 mg/die; b) fortificazione degli alimenti 0,4 mg/die; c) regime dietetico; d) nessuno dei precedenti.

Sebbene le donne appartenenti ai primi tre gruppi abbiano incrementato l'assunzione di acido folico/folato, questo cambiamento ha avuto un impatto sulla folatemia solo nelle donne assegnate al gruppo della supplementazione (a) e fortificazione (b) (32).

D'altronde, in diversi studi (33, 34) è stato rilevato che per raggiungere l'assunzione raccomandata nel periodo periconcezionale è necessario un aumento di circa tre volte dell'assunzione dietetica tipica.

Realizzare questo obiettivo sulla base della sola alimentazione richiederebbe modifiche dietetiche molto rilevanti, improbabili in donne che progettano una gravidanza, e ancor di più in quelle che non la pianificano.

Nel 1992 l'autorità sanitaria statunitense (*US Public Health Service*) ha prodotto delle raccomandazioni per l'uso dell'AF per la prevenzione della spina bifida e di altri DTN per donne che programmano una gravidanza alle quali si raccomanda la dose di 0,4 mg di AF al giorno.

Tuttavia, in relazione al fatto che più della metà delle gravidanze non sono pianificate negli Stati Uniti, viene raccomandato a tutte le donne di assumere routinariamente una compressa di multivitaminico che include AF al dosaggio sopraindicato.

Inoltre, viene raccomandato alle donne di assumere cibi fortificati e di incrementare nella dieta alimenti ricchi in folati (35).

In Europa, le evidenze accumulate riguardo all'effetto protettivo dell'AF riguardo i difetti congeniti hanno indotto le autorità sanitarie di diversi Paesi a emanare specifiche linee guida e raccomandazioni nazionali: Regno Unito (1992), Irlanda (1993), Paesi Bassi (1993), Malta (1994), Finlandia (1995), Svezia (1996), Svizzera (1996), Danimarca (1997), Polonia (1997), Norvegia (1998), Portogallo (1998), Francia (2000), Spagna (2001) e Italia (2004).

Nella maggior parte dei casi, l'assunzione giornaliera raccomandata è di 0,4 mg, mentre nei Paesi bassi è 0,5mg/die e in Polonia varia da 1 mg/die fino a 4-5 mg/die in caso di rischio di ricorrenza.

Il periodo raccomandato, in relazione alla morfogenesi del tubo neurale, prevede la somministrazione di AF prima del concepimento fino al terzo trimestre di gravidanza.

Successivamente in quasi tutti questi Paesi, sono state avviate campagne di educazione sanitaria e studi per la valutazione di impatto dell'intervento.

In particolare è stata valutata la percentuale di donne che assumono AF nel periodo raccomandato, con la rilevazione di valori che sono più alti in Norvegia, Regno Unito, Olanda e Irlanda con percentuali che oscillano tra il 30 e il 46%. Percentuali estremamente basse sono state rilevate in Francia, Spagna e Italia con valori inferiori al 10% (36).

In particolare in Italia sono stati condotti due studi: il primo in Emilia Romagna nel 1999 da Cocchi *et al.* (2000) (37) e il secondo in Toscana da Bianchi *et al.* (2002) (38).

I risultati dello studio condotto in Emilia Romagna, su un campione di 302 donne con bambini sani, hanno evidenziato che solo 9 di queste (3%) hanno assunto AF nel periodo periconcezionale ed evidenziato una associazione statisticamente significativa del comportamento adeguato con il livello di istruzione e l'età (>30).

Dallo studio condotto in Toscana è risultato che su un campione di 1.066 rispondenti intervistate tra febbraio e aprile 2002, il 5.7% (n. 61) delle donne aveva assunto AF come raccomandato, il 52% (n. 546) l'aveva assunto ma non nel periodo periconcezionale mentre il 43% non l'ha assunto affatto (in 7 casi l'informazione è andata perduta). Le ragioni riportate più frequentemente per la mancata assunzione sono state: "non specificatamente suggerito dal medico" (37%) e "non ne ho percepito il bisogno in quanto mangio bene" (20%).

Dagli studi sopra riportati risulta, quale elemento rilevante per l'impostazione di strategie di sanità pubblica la modesta percentuale di donne che assumono l'AF nella quantità e nel periodo raccomandato, mentre è molto più frequente l'uso della supplementazione in fasi avanzate della gravidanza, a testimonianza di inappropriatazza.

Questo elemento spiega in parte i risultati non soddisfacenti ottenuti mediante supplementazione in diversi Paesi europei come risulta dalla Tabella 3, da cui risulta che ad eccezione del Messico non si sono prodotte rilevanti modifiche nella occorrenza dei DTN prima e dopo la supplementazione.

Tabella 3. Effetto dell'AF sull'occorrenza di NTD con la sola raccomandazione della supplementazione.

Paesi	Supplementazione raccomandata di AF	Occorrenza di NTD prima della supplementazione	Occorrenza di NTD dopo la supplementazione	Modificazione (%)
Unione Europea (39)	Supplementazione di AF 400µg die	1 per 1000 nati vivi	1 per 1000 nati vivi	0
Messico (40)	Supplementazione di AF 500µg una volta a settimana	1,04 per 1000 nati	0,58 per 1000 nati	-44
Norvegia (41)	Supplementazione di AF 400µg die	0,85 per 1000 nati vivi (1980-1992)	Nessuna riduzione osservata nei tassi NTD (0,88 per 1000 nati vivi, 1993-2003)	+4

In Italia, nell'aprile del 2004 si è costituito il Network Italiano per la Promozione dell'Acido Folico per la Prevenzione Primaria di Difetti Congeniti (42).

L'obiettivo principale del Network è di promuovere, armonizzare e rendere più visibili azioni in favore di un maggior apporto di AF nel periodo peri-concezionale, come strategia necessaria per attuare programmi di prevenzione primaria di alcuni difetti congeniti. Il Network ha già elaborato e approvato la seguente Raccomandazione per la riduzione del rischio di difetti congeniti mediante l'uso peri-concezionale dell'AF e attualmente si sta adoperando per darne massima diffusione su tutto il territorio nazionale:

Si raccomanda che le donne che programmano una gravidanza, o che non ne escludono attivamente la possibilità, assumano regolarmente almeno 0,4 mg al giorno di acido folico per ridurre il rischio di difetti congeniti. È fondamentale che l'assunzione inizi almeno un mese prima del concepimento e continui per tutto il primo trimestre di gravidanza.

La raccomandazione sulla supplementazione periconcezionale di AF per la prevenzione primaria di difetti congeniti, indica la promozione di una dieta corretta ed equilibrata quale elemento fondamentale nella strategia complessiva di sanità pubblica per la prevenzione di difetti congeniti.

Per sviluppare le attività del Network sono stati formati i seguenti Gruppi di lavoro: "Advocacy", "Alimentazione appropriata e fortificazione degli alimenti", "Disponibilità di prodotti farmaceutici, OTC e specialità", "Formazione del personale socio-sanitario", "Promozione e informazione alla popolazione", "Ricerca", "Sorveglianza e valutazione dell'impatto".

Attualmente aderiscono al Network 163 strutture pubbliche e private. Sono attivamente coinvolti ricercatori dell'ISS, dell'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione,

del CNR, funzionari del Ministero della Salute e delle Regioni, operatori delle ASL (ginecologi, pediatri, ecc.), medici di medicina generale, esponenti del mondo medico universitario e ospedaliero, giornalisti, rappresentanti dei pazienti e delle loro famiglie, ecc. L'adesione al Network e la partecipazione alle attività sono tuttora aperte a tutti i colleghi coinvolti nella tutela della salute materno-infantile, nella sorveglianza delle patologie congenite e nella promozione di appropriati stili di vita e alimentari.

Nell'aprile del 2005 l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ha comunicato l'approvazione all'immissione in commercio di 94 nuovi farmaci rimborsati dal Servizio Sanitario Nazionale, tra cui Figura l'AF "per la profilassi dei difetti dello sviluppo del tubo neurale in donne che stanno pianificando la gravidanza". Ciò, rappresenta oltre a un riconoscimento istituzionale dell'efficacia dell'AF nella prevenzione di difetti congeniti un importante supporto per tutte le azioni di sanità pubblica volte alla promozione della supplementazione (43, 44).

L'intervento di sanità pubblica che si sta svolgendo nel nostro Paese (elaborazione diffusione e implementazione della raccomandazione) prevede sia una valutazione dell'impatto in termini di variazioni della prevalenza dei difetti del tubo neurale che l'analisi dei punti critici nell'applicazione della raccomandazione.

Tra questi spicca, dall'analisi sopra riportata, l'elemento della modesta percentuale di donne che entrano in gravidanza che assume AF nella quantità e nel periodo raccomandato, mentre è molto più frequente l'uso della supplementazione in fasi avanzate della gravidanza, a testimonianza di inappropriatazza.

In diversi Paesi dalla fine degli anni '90 (USA, Canada, Cile, Costa Rica) è stata intrapresa la via della fortificazione degli alimenti (in particolare della farina di grano). La fortificazione è in grado, almeno teoricamente, di assicurare a tutte le donne in età fertile, indipendentemente dalla programmazione della gravidanza, un apporto supplementare di AF.

La scelta di contenere la supplementazioni a dosaggi sub-ottimali (0,1-0,2mg/100g di farina) risponde ad un principio precauzionale, teso ad evitare che la somministrazione di folati possa mascherare (soprattutto nella popolazione anziana) i segni ematologici di anemia megaloblastica.

I risultati ottenuti dalla strategia di fortificazione sono stati incoraggianti (Tabella 4).

Tabella 4. effetti della fortificazione sull'occorrenza di DTN in diversi Paesi

Autore	Paese	Modificazione % DTN pre-post fortificazione
Persad 2002 (45)	Canada (Nova Scotia)	-65
Ray 2000 (46)	Canada (Ontario)	-49
Mathews 2002 (47)	USA	-0,22 Anencefalia -0,24 Spina bifida
Castilla 2003 (48)	Cile	-0,47
Chen 2001 (49)	Costa Rica	-0,36
Liu (50)	Canada (New Foundland)	-0,78

Rispetto alla strategia di supplementazione, tuttavia, la fortificazione generalizzata comporta la necessità di una valutazione rischi-benefici specie se adattata ad una popolazione quale quella italiana, a forte consumo di farinacei. Infatti questa strategia espone tutta la popolazione, (compresi anziani e bambini) ad un intervento che prospetta vantaggi per una esclusiva sottopopolazione (donne in età fertile).

In conclusione, sulla base di questi elementi si ritiene che nessuna di queste strategie isolate sia in grado di affrontare efficacemente il problema, mentre una strategia combinata appare più adeguata (51).

Bibliografia

1. Istituto Nazionale di Statistica. *Tavole di mortalità della popolazione residente. Anno 2003*. Roma: ISTAT; 2006. Disponibile all'indirizzo: http://www.istat.it/salastampa/comunicati/non_calendario/20061024_00/; ultima consultazione 30/10/2006.
2. Pomerance JJ, Morrison A, Williams RL, Schiffrin BS. Anencephalic infants: life expectancy and organ donation. *J Perinatol* 1989;9(1):33-7.
3. EUROCAT. *Prevalence data. Selection criteria*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.biomedical.co.uk/eurocatlive/search.cgi>; ultima consultazione 31/10/2006.
4. Bianchi F, Taruscio D. *Registro nazionale malattie rare. Epidemiologia di 44 malformazioni congenite rare in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2002. (Rapporti ISTISAN 02/36).
5. Carnovale E. Assunzione di folati nella dieta italiana. In: Mantovani A, Stazi AV, Taruscio D. *Interazioni geni e ambiente: folati e malformazioni congenite*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2002. (Rapporti ISTISAN 02/26). p. 3-15.
6. Wills L. Treatment of "pernicious anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia" with special reference to yeast extract as a curative agent. *Br Med J* 1931;1:1059-64.
7. Food and Nutrition Board, National Research Council. *Maternal nutrition and the course of pregnancy*. Washington, DC: National Academy of Sciences; 1970.
8. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Childh* 1976;51:944-50.
9. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;(3):CD001056.
10. Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981;282(6275):1509-11.
11. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *The Lancet* 1991;20.338(8760):131-7.
12. Kirke PN, Daly LE, Elwood JH. A randomised trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. The Irish Vitamin Study Group. *Arch Dis Child* 1992;67(12):1442-6.
13. Czeizel AE, Dudas I, Metneki J. Pregnancy outcomes in a randomised controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation. Final report. *Arch Gynecol Obstet* 1994;255(3):131-9.
14. Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, Fielding DW, Walker S, Schorah CJ, Wild J. Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *The Lancet* 1983;1(8332):1027-31.
15. Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 1988;260:3141-5.
16. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, Willett W. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 1989;262(20):2847-52.
17. Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a casecontrol study in western Australia. *Med J Aust* 1989;150:613.
18. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 1993;269:1257-61.

19. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J. Prevention of neural tube defects with folic acid in China. China-US. Collaborative project for neural tube defect prevention. *N Engl J Med* 1999;341:1485-90.
20. Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR, Walden ME, Depp OR, Hoffman HJ. The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural tube defects. *N Engl J Med* 1989;150:613.
21. Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 1995;51:71-8.
22. Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology* 2001;63:79-86.
23. Czeizel AE, Timar L, Sarkozi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics* 1999;104(6):e66.
24. Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol* 1996;143(12):1229-34.
25. Czeizel AE. Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation. *Am J Med Genet* 1996;62(2):179-83.
26. Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use. *Am J Epidemiol* 2000;151(9):878-84.
27. Li DK, Daling JR, Mueller BA, Hickok DE, Fantel AG, Weiss NS. Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Epidemiology* 1995;6:212-8.
28. Czeizel AE. Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;78(2):151-61.
29. Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 1995;536-45.
30. Yang Q, Khoury MJ, Olney RS, Mulinare J. Does periconceptional multivitamin use reduce the risk for limb deficiency in offspring? *Epidemiology* 1997;8:157-61.
31. Botto LD, Olney RS, Erickson JD. Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004;125(1):12-21.
32. McNulty H, Cuskelly GJ, Ward M. Response of red blood cell folate to intervention: implications for folate recommendations for the prevention of neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5 Suppl):1308S-11S.
33. Subar AF, Block G, James LD. Folate intake and food sources in the US population. *Am J Clin Nutr* 1989;50(3):508-16.
34. Bailey LB, Gregory JF 3rd. Folate metabolism and requirements. *J. Nutr* 1999;129:779-82.
35. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41(RR-14):1-7.
36. EUROCAT. *Prevention of Neural Tube Defects by Periconceptional Folic Acid Supplementation in Europe*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/pubdata/Folic-Acid.html>; ultima consultazione 30/10/2006.
37. Cocchi G, Gualdi S, Mammoliti PM, Piccolo L. Primary prevention of neural tube defects: lack of information about folic acid supplementation in Italy: Emilia-Romagna region NTD & Primary prevention strategies: European Medical Research Concerted Action. Biomed 2. 1st International Symposium on Prevention and Epidemiology of Congenital Malformations. Cardiff, September 15-16 2000. *Frontiers in Fetal Health Vol 2*, pp 9- 11.

38. Bianchi F, Botto L, Caramelli L, Carmignani A, Di Tanna G.L, Dukic T, Garcia Bonillo SC, Mastroiacovo P, Pierini A, Scarinci R, Sorace M, Strigini F, Watkins M. *Folic acid in Tuscany, Italy: what do women know, think, and do?* 30th ICBDMs annual meeting, Clermont-Ferrand 2003.
39. Botto LD, Lisi A, Robert-Gnansia E, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, *et al.* International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendations: are the recommendations working? *BMJ* 2005;12;330(7491):571-8.
40. Martinez de Villarreal L, Perez JZ, Vazquez PA, Herrera RH, Campos Mdel R, Lopez RA, *et al.* Decline of neural tube defects cases after a folic acid campaign in Nuevo Leon, Mexico. *Teratology* 2002;66(5):249-56.
41. Nilsen RM, Vollset SE, Gjessing HK, Magnus P, Meltzer HM, Haugen M, Ueland PM. Patterns and predictors of folic acid supplement use among pregnant women: the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 2006;84(5):1134-41.
42. Taruscio D, Agazio E, Salerno P. Prevenzione primaria di difetti congeniti mediante una vitamina: l'acido folico. *Not Ist Super Sanità* 2005;18(5):11-17.
43. Acido folico. Prove di efficacia e considerazioni utili per la riduzione del rischio di malformazioni congenite. *Bollettino d'informazione sui farmaci*. 2004;(2)Anno XI:66-75.
44. Agenzia Italiana del Farmaco. *CdA approva l'autorizzazione all'immissione in commercio di 94 nuovi farmaci* Comunicato Stampa 20 aprile 2005. Roma. Disponibile all'indirizzo: http://www.agenziafarmaco.it/aifa/servlet/section.khtml?target=&area_tematica=RICERCA§ion_code=AIFA_RICERCA&entity_id=111.14641.1136995915093; ultima consultazione 30/10/2006.
45. Persad VL, Van den Hof MC, Dube JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ* 2002;167:241-5.
46. Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Boss S, Wyatt PR, Cole DE. Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. *The Lancet* 2002;360:2047-8.
47. Mathews TJ, Honein MA, Erickson JD. Spina bifida and anencephaly prevalence--United States, 1991-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:9-11.
48. Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS, Dutra Mda G, Nazer-Herrera J, Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC). Preliminary data on changes in NTD after folic acid fortification. *Am J Med Genet* 2003;123A:123-8.
49. Chen LT, Rivera MA. The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutr Rev* 2004;62(6 Pt2):S40-3.
50. Liu S, West R, Randell E, Longerich L, O'Connor KS, Scott H, Crowley M, Lam A, Prabhakaran V, McCourt C. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. *BMC Pregnancy Childbirth* 2004;4:20-30.
51. Eichholzer M, Tonz O, Zimmermann R. Folic acid: a public-health challenge. *The Lancet* 2006;22;367(9519):1352-61.

ASPETTI NUTRIZIONALI DEI FOLATI

Ruggeri Stefania¹, Rossi Laura², Carnovale Emilia³
Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione

Introduzione

La carenza di folati nella dieta (intendendo per folati sia i folati naturali presenti negli alimenti che l'acido folico di sintesi fornito da compresse o fortificazione) è un fattore di rischio (forse il principale) per l'insorgenza di tutte le diverse patologie dipendenti da un alterato metabolismo di questo nutriente essenziale: dai difetti congeniti, alle patologie cardiovascolari, tumorali, neurodegenerative, tutti fenomeni di forte impatto non solo sulla salute del singolo individuo ma anche sulla società.

La conoscenza del contenuto in folati degli alimenti, il loro contenuto nella dieta e la definizione delle raccomandazioni nutrizionali per il loro apporto adeguato nella dieta sono gli elementi conoscitivi di base per provvedere al mantenimento dello stato di salute e alla prevenzione di patologie dell'individuo nelle diverse situazioni fisiologiche.

Questi due fattori rappresentano anche gli strumenti di base per la programmazione di interventi di salute pubblica per il miglioramento dello stato di nutrizione per i folati per gruppi di popolazione e per la popolazione in generale.

Pertanto in questo capitolo verranno affrontate le problematiche relative ai folati negli alimenti (metodi analitici di determinazione, loro contenuto negli alimenti, biodisponibilità, apporto con la dieta), le problematiche relative alla definizione delle raccomandazioni per una loro adeguata assunzione (evoluzione nel tempo, significato nutrizionale, ricadute) e le strategie mediante le quali si tende ad assicurare un introito ottimale.

Questi diversi aspetti verranno trattati prenderanno in esame sia le problematiche di base che quelle tuttora in discussione.

I folati negli alimenti

Dalla cura delle anemie agli effetti sull'omocisteina

Mitchell negli anni quaranta (1) fu il primo ad utilizzare il termine acido folico, dal latino *folium* (foglia), per indicare alcune sostanze estratte da foglie di spinaci biologicamente attive contro alcune forme di anemie, anche se già qualche anno prima alcuni studiosi avevano verificato l'efficacia di alcuni estratti di fegato e di lieviti per la cura di queste patologie (2, 3).

I composti presenti in tali estratti venivano quantificati mediante la crescita di alcuni microrganismi come lo *Streptococcus lactis* e il *Lactobacillus casei* che però rispondevano diversamente in relazione al tipo di estratto somministrato (4). Studi successivi dimostrarono che tale diversità di risposta era dovuta al numero dei residui di acido glutammico associati alla molecola di acido folico (5, 6). I primi studi di struttura furono allora dedicati all'individuazione

¹ La dott.ssa Ruggeri ha curato la sezione "I folati negli alimenti"

² La dott.ssa Rossi ha curato la sezione "I livelli di assunzione raccomandati di folati"

³ La dott.ssa Carnovale ha curato la sezione "Strategie per aumentare l'apporto di folati nella dieta"

del numero dei residui di acido glutammico delle molecole di acido folico, considerati fattori limitanti la biodisponibilità di tale composto (7, 8).

Successivamente studi conformazionali di NMR svolti negli anni ottanta, dimostrarono la presenza negli alimenti delle forme ridotte dell'acido folico e cioè dei diidrofolati, tetraidrofolati con sostituzioni sull'anello pterinico di gruppi metilici e formilici, che danno origine a 5-metiltetraidrofolati, 5-formiltetraidrofolati, 5,10- formiltetraidrofolati (9, 10). La presenza di tali diverse forme e dei diversi stereoisomeri era responsabile della differente risposta metabolica da parte dei microrganismi utilizzatori.

Tra gli anni ottanta e novanta la messa a punto di nuove metodologie HPLC per la determinazione delle forme e dei contenuti dei folati negli alimenti ha dimostrato che l'acido pteroilglutammico – la forma completamente ossidata con un residuo di acido glutammico – è presente negli alimenti in quantità molto limitata. È essenzialmente un prodotto di sintesi ed è tra le forme più utilizzate insieme al 5-metil-tetraidrofolato e alla folacina, cioè il 5-formiltetraidrofolato, per la formulazione dei complessi vitaminici e viene utilizzato per la produzione di alimenti fortificati poiché notevolmente più stabile e maggiormente biodisponibile rispetto ai folati naturali.

Negli alimenti sono presenti principalmente le forme ridotte dell'acido folico come i tetraidrofolati che con sostituzioni sull'anello pterinico danno origine ai 5-metiltetraidrofolati, ai 5-formiltetraidrofolati, ai 5,10-formiltetraidrofolati, generalmente presenti come poliglutammati.

Quindi, fino a pochi anni fa e spesso, purtroppo, ancora oggi, il nome acido folico viene riferito anche ai composti presenti negli alimenti. La distinzione e il corretto uso dei due termini sono pertanto quanto mai necessari alla luce della diversa biodisponibilità del composto sintetico e dei folati naturali, e quindi dei diversi effetti sulla salute dell'uomo.

Da tutti questi studi si poteva evincere che le molecole dei folati presentavano perciò “due diversi gruppi funzionali” in grado di influenzare la loro biodisponibilità: da un lato il numero di residui di acido glutammico (fino a sette) e dall'altro la presenza delle forme ridotte e dei sostituenti sull'anello pterinico. Sulla base della diversa risposta dei batteri al numero di residui di acido glutammico, i primi studi si incentrarono sulla quantificazione dei folati monoglutammati, considerati più biodisponibili (folati liberi), e dei folati poliglutammati, più limitati nell'assorbimento.

Chandler (11) e Bhandari (12) dimostrarono successivamente che nell'uomo i poliglutammati presenti negli alimenti vengono idrolizzati a mono, di-glutammati ad opera di un'esopeptidasi zinco-dipendente presente sulle cellule della mucosa, dimostrando che il numero di residui di acido glutammico non rappresentava il principale fattore limitante la biodisponibilità di tali composti.

Le forme monogluttamate vengono assorbite nell'intestino a livello del digiuno, attraverso un meccanismo di trasporto attivo pH-dipendente. Ad alte concentrazioni intraluminali e durante particolari stati fisiologici quali la gravidanza, l'allattamento, o in presenza di particolari patologie, viene attivato un meccanismo di trasporto passivo per aumentare l'assorbimento dei folati (13, 14). L'acido folico è attivo nell'organismo solo dopo la riduzione a tetraidrofolato, che viene operata da una diidrofolato reductasi in grado di ridurre l'acido folico a diidrofolato e il diidrofolato a tetraidrofolato. Fattori di protezione quali l'acido ascorbico e i tioli riducenti presenti in alcuni alimenti, possono proteggere i derivati dell'acido folico dall'ossidazione che può avvenire nell'ambiente acido dello stomaco (15). Dopo l'assorbimento, la maggior parte dei folati viene depositata nel fegato, dove vengono riconvertiti a derivati poliglutammati o rilasciati nel sangue e trasportati come 5-metiltetraidrofolato monogluttammato (16). I folati escreti nella bile passano nel circolo enteroepatico e possono essere riassorbiti (17).

La forma biologicamente attiva nell'organismo è il tetraidrofolato, che agisce come coenzima in molte reazioni che comportano il trasferimento di unità monocarboniose, tra cui le più importanti sono quelle che portano alla sintesi delle purine e dell'acido deossitimidilico, essenziale per la sintesi del DNA e dell'RNA. Una tra le funzioni più importanti è la rigenerazione della metionina dall'omocisteina che, dopo una conversione in S-adenosilmetionina, opera in maniera ciclica come metildonore in una serie numerosa di reazioni. Il doppio ciclo metabolico in cui sono coinvolti i folati tiene conto delle tante e possibili implicazioni sullo stato di salute dell'uomo e pertanto spesso i folati vengono considerati come un po' la panacea di molti mali.

Per ora è stato dimostrato in modo conclusivo che gravi stati carenziali in folati sono associati a anemie megaloblastiche e che la supplementazione con acido folico nel periodo periconcezionale è in grado di ridurre l'incidenza di alcuni difetti congeniti come i Difetti del Tubo Neurale (18-20). È stato dimostrato che i folati sono in grado di abbassare i livelli di omocistemia plasmatica (21-24) e quindi possibilmente ridurre il rischio delle malattie cardiovascolari.

Gli studi degli effetti protettivi dei folati su alcune tipologie di tumori e su alcune malattie degenerative come le demenze senili, sono oggi ancora controversi e non ancora conclusivi (25-27).

Metodi di determinazione, contenuti e forme

Lo studio del contenuto totale in folati e l'individuazione delle forme presenti negli alimenti – mono e poliglutammati, forme ridotte e ossidate – ha presentato notevoli difficoltà dovute a vari fattori quali la loro bassa concentrazione, l'instabilità al calore, alla luce, al pH e l'eventuale compresenza nell'alimento di coniugasi endogene, che possono convertire i poliglutammati in mono, di, triglutammati (28).

In relazione alla capacità di utilizzazione dei folati come fattori di crescita ad parte di alcuni batteri, le prime metodologie messe a punto si basarono sull'uso di microrganismi (analisi microbiologiche). Il microrganismo più utilizzato fu ed è tuttora il *L. casei* in quanto in grado di rispondere ad una più ampia varietà di forme di folati, - tra cui il 5-metiltetraidrofolato monoglutammatato, la forma predominante negli alimenti-, e in parte anche a di e triglutammati. Scarsa sensibilità dimostra, invece, verso i folati poliglutammati (29, 30). Quando ancora non era stato chiarito il meccanismo di azione della deconiugasi umana endogena, i folati venivano differenziati in: folati "liberi" (i folati monoglutammati) che si credevano pronti all'assorbimento e folati "coniugati" (i folati poliglutammati), che venivano quantificati solo dopo il trattamento con deconiugasi (30) a più bassa biodisponibilità.

Tale classificazione è ormai stata completamente abbandonata alla luce delle conoscenze sul meccanismo di assorbimento intestinale dei folati.

I folati sono però presenti negli alimenti, non solo come poliglutammati, ma spesso in complessi legati a macromolecole come amido e proteine.

E perciò all'inizio degli anni novanta fu introdotto un nuovo metodo per l'estrazione dei folati dalla matrice alimentare che prevedeva, oltre al tradizionale trattamento con la deconiugasi, il trattamento della matrice alimentare con proteasi e amilasi (31). L'applicazione di questa nuova metodologia ha permesso di ottenere rese in folati a volte superiori del 30-40% rispetto all'estrazione effettuata solamente con deconiugasi (32-34). Si sono dimostrati critici per ottenere risultati accurati anche il tempo di incubazione e il pH ottimale per l'attività di ogni enzima (35, 36). Attualmente l'unico metodo ufficialmente riconosciuto per la determinazione dei folati negli alimenti è il metodo microbiologico proposto dall'AOAC International 922.05 (37), che utilizza il *L. casei* come microrganismo. Altri batteri che vengono impiegati, anche se

in misura inferiore, sono lo *Streptococcus faecalis*, sensibile sia alle forme ossidate che a quelle ridotte dell'acido pteroilglutammico, e il *Pediococcus cerevisiae*, sensibile però solo alle forme monoglutammate ridotte (28). Le metodologie microbiologiche sono caratterizzate da tempi piuttosto lunghi di esecuzione e spesso da un'alta variabilità interlaboratorio, come dimostrato da alcuni ring-test (38, 39). Negli ultimi anni, però, l'introduzione di culture crioprotette di *Lactobacillus* (40) e l'uso di micropiastre hanno permesso non solo di ottenere risultati più accurati, ma anche maggiore riproducibilità nelle prove (41).

Dagli anni ottanta, accanto allo sviluppo e al perfezionamento dei metodi microbiologici si è resa sempre di più necessaria l'esigenza di avere a disposizione metodologie analitiche rapide e accurate in grado di separare e quantificare i folati naturali presenti negli alimenti. Sono state via via messe a punto metodiche HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) che hanno individuato e caratterizzato le diverse forme presenti negli alimenti (5-metiltetraidrofolati, 5-formiltetraidrofolati (42-47). Inoltre, alcuni autori hanno proposto metodi cromatografici in grado di separare e di identificare la presenza delle diverse forme di folati poliglutammati (48).

Ciò ha permesso un notevole *input* per la conoscenza della biodisponibilità dei folati alimentari e per lo studio della loro via metabolica. Occorre però ricordare che tali metodi cromatografici spesso si sono dimostrati non in grado di determinare il contenuto totale in folati negli alimenti, fornendo dati sottostimati rispetto a quelli ottenuti con i metodi microbiologici (39, 46).

I folati sono presenti in quantità significative negli alimenti di origine vegetale. Fonti principali sono gli asparagi, i carciofi, gli spinaci, i broccoli, i legumi e, tra la frutta, alcuni agrumi come le arance, i pompelmi, le clementine, oltre ai kiwi e alle fragole che possono essere considerati delle buone fonti di folati.

La presenza dei folati è, invece, scarsa negli alimenti di origine animale. L'eccezione è rappresentata dalle uova che hanno un buon contenuto di folati e dalle frattaglie (es. fegato e rene) che ne sono particolarmente ricche, ma, il cui consumo oggi non è peraltro consigliato. Il lievito di birra presenta elevati contenuti in folati: 1250mcg/100g.

In Tabella 1 è riportato uno schema riassuntivo degli alimenti con alto, medio e basso contenuto in folati naturali totali.

Tabella 1. Esempi del diverso contenuto in folati di alcuni alimenti diffusi in Italia

Contenuto in folati	Alimenti
alto (300-100 mcg/100g)	asparagi, broccoli, carciofi, cavolini di Bruxelles, cavoli, frattaglie (fegato, rene), cereali da colazione
medio (99-40 mcg/100g)	fave, spinaci, bietta, rape rosse, pomodori ciliegino, agrumi,(arance, mandarini), kiwi, avocado, formaggi (camembert, gorgonzola, parmigiano, taleggio), indivia, frutta secca (mandorle, noci, pistacchi) ceci, uova
moderato (39-20 mcg/100g)	pompelmo, fragole, patate, radicchio, pane, pizza
basso (19-5 mcg/100g)	carne, pesce, latte, yogurt

Come è stato precedentemente scritto, il nome acido folico e, quindi, folati deriva dal nome latino "folium" in quanto, al momento della sua scoperta, i livelli più elevati erano stati individuati nei vegetali a foglia verde e, più precisamente, negli spinaci. Per tale ragione i primi lavori sono state condotti soprattutto sugli alimenti di origine vegetale, come frutta e verdura (43, 46, 47). Più recentemente l'attenzione si è spostata sui prodotti cerealicoli poiché, anche se caratterizzati da livelli non particolarmente alti in folati, rappresentano la principale fonte di

questa vitamina nella maggior parte delle diete. Inoltre a causa dell'introduzione della fortificazione obbligatoria di farine di cereali operata da alcuni paesi, molti lavori sono stati condotti sui prodotti cerealicoli (49, 50).

Altri studi recenti sono incentrati sullo studio di prodotti lattiero-caseari al fine di individuare contenuti e fattori in grado di limitare la biodisponibilità dei folati (51, 52). Uno studio ha inoltre dimostrato che il consumo quotidiano di latte migliora la biodisponibilità dei folati introdotti con la dieta, portando ad un aumento dei livelli di folati eritrocitari e ad una relativa diminuzione dei livelli plasmatici di omocisteina (53).

Il contenuto in folati per porzione di alcuni alimenti di origine vegetale è riportato in Figura 1.

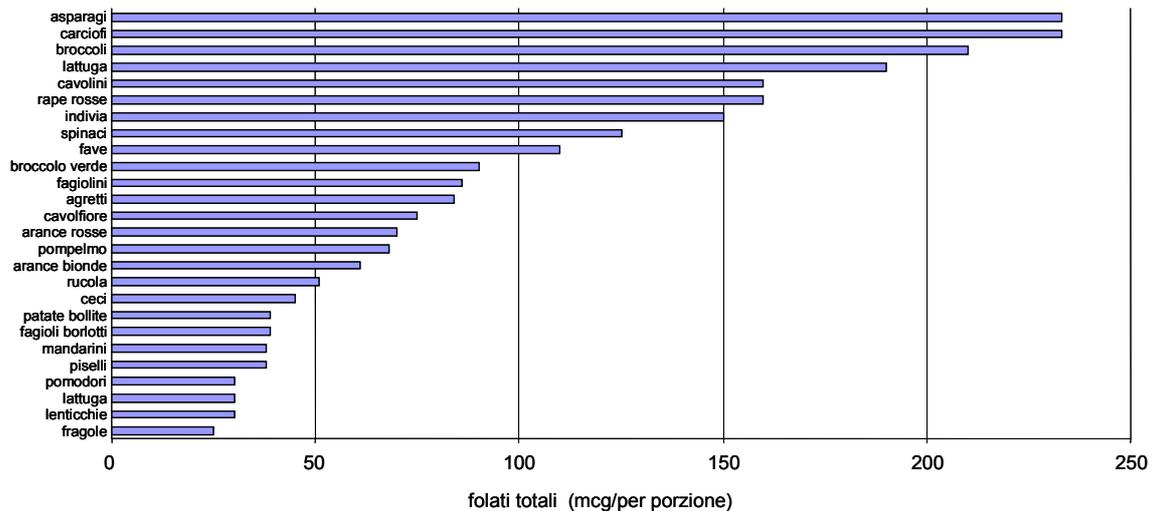


Figura 1. Contenuto in folato di alcuni elementi di origine vegetale

Il consumo di tali alimenti può essere consigliato per aumentare l'apporto giornaliero in folati, senza portare a sostanziali cambiamenti nel contributo energetico. Molti di questi alimenti sono anche ricchi di altre vitamine e di composti antiossidanti, benefici per la nostra salute.

In Tabella 2 sono riportate alcune combinazioni di alimenti che quotidianamente possono arrivare a fornire 400mcg di folati. Tali livelli sono consigliati per avere un effetto nel miglioramento dello stato di nutrizione per i folati ma non possono sostituire il supplemento vitaminico nella prevenzione delle malattie congenite.

Tabella 2. Alcuni esempi di combinazioni di alimenti che insieme possono arrivare a fornire 400 mcg di folati*

Combinazioni	Alimenti
1	asparagi , kiwi, mandarini, lattuga
2	cavolfiore, indivia, arance, kiwi
3	carciofi, cavolini di Bruxelles, fragole, mandarini
4	asparagi, cavolfiore, arance rosse, fragole
5	rape rosse, agretti, clementine, arance
6	spinaci, rape rosse, pompelmo, arance bionde

* Il calcolo è effettuato per porzione al consumo.
(modificato da Ruggeri *et al*, 2004) (84)

Come già accennato gli studi HPLC hanno permesso l'identificazione delle forme dei folati presenti negli alimenti di cui alcuni esempi sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3. Contenuti e forme dei folati in alcuni alimenti (espressi come mcg/100g)

Alimenti	Folati totali (mcg/100g)	5-CH ₃ -H ₄	5-CHO-H ₄	10-CHO-H ₄	10-CHO-H ₂	H ₄	Acido folico
Arance rosse*	45,6	43,6	-	-	-	2,0	-
Carciofi cotti *	123,3	104,5	-	1,2	-	17,3	tracce
Broccolo verde*	125	122	-	-	-	tracce	tracce
Latte intero [^]	7	7	-	-	-	-	-
Pane d'avena ⁺	41	8,4	2,2	10,1	15,8	0,7	3,3
Pane comune*	50	?	?	?	?	?	?
Pane fortificato con acido folico ^{**}	324	25	16	6	-	9	268
Pomodorini ciliegino*	40,1	38,1	-	-	-	2	-
Spaghetti, crudi*	47,2	8	23	48	20	-	1
Yogurt intero [^]	15	1	13	-	-	1	-

*Ruggeri *et al*, 1999 (46); [^]Forsen *et al*, 2000 (85); ⁺Kariluoto *et al*, 2004 (86); ^{**}Osseyi *et al*, 2001 (87).

Tendenzialmente la forma più rappresentata è il 5-metiltetraidrofolato: essa rappresenta, in frutta e verdura, circa il 90% del contenuto totale. Nei prodotti cerealicoli, così come in alcuni prodotti lattiero caseari come lo yogurt, le forme più rappresentate sono i formili come il 5-formiltetraidrofolati e il 10-formiltetraidrofolati.

Per quanto riguarda gli alimenti fortificati, in Italia esiste una fortificazione volontaria adottata per ora solo da alcune industrie alimentari.

In Tabella 4 sono riportati anche alcuni esempi di alimenti fortificati con acido folico presenti sul nostro mercato e il relativo contenuto in folati. Gli alimenti fortificati sono caratterizzati da elevati contenuti in folati (al di sopra dei 100 mcg/100g) e particolarmente ricchi ne sono i cereali da colazione.

Tabella 4. Alcuni esempi di alimenti fortificati con acido folico presenti sul mercato italiano e contenuto in folati

Alimenti	Marche in commercio considerate (n.)	Folati (min-max) (mcg/100 g)
Biscotti per l'infanzia	2	115.5 (88.2-143.0)
Cereali da colazione, corn flakes	5	153.8 (146.1-162.3)
Cereali da colazione, fiocchi di frumento	5	330.0 (292.1-351.0)
Fette biscottate	2	110.3 (100.0-120.6)
Spaghetti, integrali, crudi	1	200.9
Spaghetti, integrali cotti	1	30.7
Succhi di frutta multivitaminici	5	78.6 (55-116)

Nel caso della pasta la fortificazione della semola non porta però ad un reale successo nel prodotto al consumo poiché più dell'70% dell'acido folico presente nel prodotto crudo viene perso in seguito a cottura: probabilmente l'acido folico aggiunto per la fortificazione non è inglobato nella matrice alimentare e quindi più facilmente solubile.

I folati presenti negli alimenti non sono del tutto stabili, sono sensibili all'ossidazione e alla luce e vengono in parte distrutti con le normali tecniche di cottura. La struttura dell'alimento e la durata del trattamento termico sono importanti ai fini della stabilità dei folati.

Per alcuni vegetali dopo bollitura si osserva una perdita sostanziale dei folati (40-50%), mentre la cottura a vapore non provoca perdite significative in folati (54). Altri alimenti, come alcuni cereali e tuberi, mantengono pressoché inalterato il contenuto in folati anche dopo bollitura, con perdite inferiori al 10% del contenuto totale.

Biodisponibilità, bioaccessibilità e bioefficacia dei folati e il concetto di folati equivalenti

Il concetto di biodisponibilità, classicamente utilizzato in campo nutrizionale e inteso come “la frazione di un nutriente che è disponibile all'utilizzazione da parte dell'organismo in normali stati fisiologici” (55), è oggi affiancato da nuovi concetti come quelli di bioefficacia, bioaccessibilità (56,57) le cui definizioni sono riportate in Tabella 5.

Tabella 5. Definizioni di biodisponibilità, bioaccessibilità e bioefficacia

Concetto	Definizione
Biodisponibilità	La quota di un nutriente assorbita a livello intestinale per l'utilizzazione in condizioni fisiologiche normali*
Bioaccessibilità	La quota di un nutriente rilasciata dalla matrice alimentare e disponibile all'assorbimento ^
Bioefficacia	La frazione di un nutriente che un effetto positivo su uno o più parametri funzionali§

*Jackson, 1997 (55). ^Verwei *et al*, 2003 (57). §Brouwer *et al*, 2001 (56).

Tali concetti aiutano ad esaminare da punti di vista differenti le “sorti” e quindi gli effetti dell'ingestione di un nutriente nell'organismo e aiutano a differenziare i risultati ottenuti dagli studi progettati in modo diverso e che fino ad alcuni anni fa venivano generalmente tutti indicati come “studi di biodisponibilità”. L'introduzione dell'acronimo SLAMENGI di de Pee & West (58) da ricorda in modo efficace i diversi fattori responsabili della biodisponibilità/bioefficacia di un nutriente e quindi anche dei folati. *Species of folate; Linkage at molecular level; Amount of folate and folic acid consumed; Matrix; Effect modifiers; Nutrient status; Genetic factors; Host-related factors; mathematical Interactions between the various factors.*

A parte alcuni lavori effettuati sui composti sintetici che sono risultati piuttosto riduttivi ai fini della definizione della biodisponibilità dei folati, in quanto non viene considerato affatto l'effetto matrice dato dall'alimento, uno tra i primi studi di confronto tra biodisponibilità dei folati negli alimenti e dell'acido folico sintetico è lo studio di Tamura e Stockard (59).

Tale studio di intervento evidenzia per alcuni alimenti fonte di folati (succo d'arancia, uova, legumi, cavoli) una ridotta bioefficacia (30-80%) rispetto al composto sintetico. Il limite di tale studio è, però, rappresentato dalle alte dosi di folati somministrate che possono aver in qualche modo condizionato la risposta dell'organismo (Tabella 6).

Studi successivi effettuati su animali da esperimento hanno, invece, dimostrato una biodisponibilità relativamente più elevata per i succhi d'arancia (60, 61) rispetto a quella trovata nello studio di Tamura.

Tali studi però, come sottolineato da Gregory nel 1997 (62), presentano il limite che la deconiugasi degli animali utilizzati ha caratteristiche e attività diversa da quella umana e,

quindi, le sperimentazioni su animali non sono da considerarsi completamente predittive della biodisponibilità dei folati nell'uomo.

Gli studi successivi che hanno fornito dati più interessanti sulla biodisponibilità/bioefficacia sono una serie di studi di intervento le cui caratteristiche, limiti e risultati sono riportati in Tabella 6. Alcuni studi hanno valutato l'effetto complessivo di una dieta ricca in folati, mentre altri hanno puntato la loro attenzione su alcuni alimenti chiave.

Anche se lo studio della biodisponibilità effettuata su diete complete sembra l'approccio più esaustivo e completo rispetto a quelli incentrato su singoli alimenti, questi ultimi studi potrebbero comunque fornire interessanti informazioni per individuare alimenti da "suggerire", nel caso si voglia implementare efficacemente lo stato di nutrizione per i folati.

Inoltre, la comprensione della diversa biodisponibilità/bioefficacia dei folati naturali rispetto all'acido folico sintetico è diventato oggi importante alla luce del dibattito aperto sui possibili effetti negativi della fortificazione obbligatoria, come problemi di mascheramento di vitamina B₁₂ negli anziani, e a lungo termine problemi di possibili cambiamenti nell'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati e quindi poi nella loro espressione genica.

Dall'analisi degli studi di bioefficacia/biodisponibilità dei folati (Tabella 6) è quindi, per ora, emerso che l'acido folico sintetico presenta una bioefficacia superiore rispetto a quella dei folati naturali (59-68) e i risultati di tali studi sono stati utilizzati nella formulazione del concetto di folati equivalenti.

L'*Institute of Medicine*, nel 1998 (69), ha introdotto il concetto di "folati equivalenti" (DFE, *Dietary Folate Equivalents*).

- 1 mcg di folati da alimenti = 1mcg DFE
- 1 mcg di acido folico come fortificante = 1,7 mcg DFE
- 1 mcg di acido folico come supplemento = 2 mcg DFE

Il fattore di 1,7 è basato sull'assunzione che l'acido folico aggiunto negli alimenti è disponibile all'85% e i folati alimentari lo sono per circa il 50%. Questo indica che 100mcg di folati contenuti in una porzione di spinaci equivalgono a 100mcg di folati equivalenti, mentre negli alimenti fortificati bisogna tener conto del diverso contributo fornito dall'acido folico aggiunto.

Per ora solo gli Stati Uniti d'America hanno adottato i DFE, i cui livelli negli alimenti sono riportati nelle ultime edizioni del Database Americano, accanto ai livelli di acido folico e folati.

L'Europa sta ora discutendo sulla scelta di esprimere le raccomandazioni e i livelli di folati negli alimenti come folati equivalenti e il dubbio che ci si pone è se sia giusto dare enfasi all'efficacia del composto sintetico. Inoltre, proporre con l'introduzione dei folati equivalenti il concetto che l'effetto positivo di una dieta ricca in folati sia semplicemente valutabile come somma del contributo dei singoli alimenti, sembra alquanto riduttivo (70). Per ora solo due studi tedeschi applicano il concetto di folati equivalenti ai fini della valutazione dello stato di nutrizione per i folati (71, 72).

Tabella 6. Alcuni studi di intervento sulla biodisponibilità/bioefficacia dei folati e dell'acido folico

Autore	Studio	Risultati	Commenti
Tamura & Stockstad 1973 (59)	Studio di intervento, 6 adulti maschi, cross over: Somministrazione di differenti ali menti: succo d'arancia, uova, legumi, lattuga, cavoli. Valutazione dell'escrezione urinaria di folati.	Bioefficacia rispetto all'acido folico: 30-80%.	La bioefficacia varia molto tra i diversi prodotti. Le alte dosi utilizzate possono aver compromesso la biodisponibilità dei folati naturali.
Sauberlich <i>et al.</i> 1987 (63)	Studio di intervento 10 donne, parallelo e consecutivo. Dopo 28 giorni di <i>wash out</i> i soggetti ricevevano dosi crescenti di <i>food folate</i> e di acido folico. Misure dei folati plasmatici ed eritrocitari.	300 µg di folati da alimenti aumentano i livelli folati plasmatici ma non gli eritrocitari; i folati da alimenti hanno il 50% di biodisponibilità rispetto all'acido folico.	Studio su piccola scala e su alimenti specifici.
Cuskelly <i>et al.</i> 1996 (64)	Studio di intervento parallelo, 3 mesi, 41 donne. 5 gruppi: supplemento acido folico (400µg/d); alimenti fortificati (400µg/d); folati da alimenti(400µg/d), o consigli	L'acido folico come supplemento e nei prodotti fortificati aumenta i folati eritrocitari. I folati alimentari non hanno alcun effetto.	Lo studio è effettuato su pochi soggetti per gruppo; manca la "compliance", ma il metodo per stabilire l'"intake assessment" è valido.
Pfeiffer <i>et al.</i> 1997 (65)	Studio di intervento, <i>cross-over</i> , 14 adulti . 2 gruppi: i soggetti ricevevano [¹³ C ₅] folic acid nel pane bianco, pane integrale riso o pasta o in soluzione e [² H ₂] folic acid intravenoso; i soggetti ricevevano [¹³ C ₅] folic acid con o senza una colazione leggera.	L'assorbimento dell' acido folico marcato nell'alimento fortificato, misurato come folato urinario, non mostra differenze significative rispetto al supplemento . L'acido folico consumato dopo una colazione leggera si presenta meno disponibile all'assorbimento rispetto al controllo.	La bioefficacia dell'acido folico nei cereali fortificati è alta ma leggermente inferiore a quella del solo supplemento (15%). La variabilità di risposta tra i soggetti è alta se confrontata con studi con loading iniziale.
Brouwer <i>et al.</i> 1999 (66)	Caso-controllo, parallelo (4 wks) 62 adulti 3 gruppi: dieta ricca in folati (350mcg) +placebo; dieta povera in folati+ 500mcg folico; dieta povera in folati+ placebo. Misure dei folati plasmatici, eritrocitari e dell'omocisteina.	Bioefficacia dei folati naturali rispetto all'acido folico: sui folati plasmatici 68% folati eritrocitari 98% omocisteina plasmatica 60%	I folati da alimenti (vegetali e frutta) diminuiscono l'omocisteina , e migliorano lo stato di nutrizione per i folati. Gli effetti sono forse leggermente sovrastimati per il tipo di somministrazione effettuata di acido folico.
Riddell <i>et al.</i> 2000 (67)	Caso-controllo, parallelo (12wks), 65 adulti , 4 gruppi: gruppo dieta (consigliati per un introito di 600mcg/d); gruppo fortificazione (dieta +350-400mcg/d da alimenti fortificati); gruppo supplementazione (dieta+ 400mcg/d supplemento); controllo (dieta povera in grassi)	Cambiamento % dell'omocisteina plasmatici rispetto al controllo: Gruppo suppl: 27 Gruppo fortific: 21 Gruppo dieta: 7	L'acido folico come supplemento o negli alimenti fortificati è efficace nell'aumentare i folati plasmatici. I livelli di ingestione dei folati alimentari sono stati controllati da pochi questionari e perciò il calcolo per l'acido folico può essere stato sovrastimato.

Livelli di ingestione media giornaliera di folati nella dieta italiana

La questione di come calcolare l'introito medio giornaliero dei nutrienti con la dieta di una popolazione è stata spesso oggetto di pesanti e controverse discussioni. Infatti, la scelta della metodologia per condurre un'indagine sui consumi e per ricostituire una dieta media che sia realmente rappresentativa di una popolazione può essere discriminante e caratterizzante ai fini del "nutrient intake assessment". Un altro limite è rappresentato dal fatto che le informazioni sui nutrienti contenuti nelle diverse banche dati non esprimono la loro reale biodisponibilità e assorbimento, caratteristiche che nel caso di alcuni minerali e vitamine sono piuttosto difficili da definire. Si discute, quindi, se inserire nella valutazione dell'adeguatezza nutrizionale di una dieta per i micronutrienti un fattore di conversione che tenga conto, appunto, della loro biodisponibilità.

Per quanto riguarda i folati naturali, la questione è ancora aperta, in quanto - come abbiamo espresso precedentemente - non esistono ancora studi conclusivi su tale argomento, ma l'introduzione del calcolo dei folati equivalenti basata sulla differente biodisponibilità dell'acido folico e dei folati "naturali" presenti negli alimenti suggerisce in parte una soluzione, per ora adottata solo negli Stati Uniti.

Nello studio dei dati relativi ai livelli di ingestione medi per i folati è, inoltre, emerso che essi risultavano spesso sottostimati, in quanto le metodiche estrattive utilizzate per la determinazione del contenuto dei folati negli alimenti non assicuravano la loro completa estrazione e, quindi, un'accurata valutazione dei livelli di ingestione (73, 74).

Alla luce dei risultati più accurati ottenuti con le nuove metodologie, alcuni autori (50) hanno evidenziato/stressato la necessità di un aggiornamento dei dati sui folati disponibili nei database, aggiornamento che alcuni paesi stanno già effettuando (75, 76). Inoltre, tale necessità è imposta nei paesi come gli Stati Uniti, il Canada e altri dell'America Latina, che hanno introdotto la fortificazione obbligatoria con acido folico. Infatti, i livelli in folati totali nei prodotti cerealicoli sono superiori almeno del 20-30% rispetto a quelli dei prodotti presenti sul mercato prima della fortificazione (50).

Un'altra questione sollevata recentemente (77) è che i dati del contenuto in folati ottenuti mediante metodiche HPLC non possono essere utilizzati per la valutazione dei livelli di ingestione, come proposto da Konings *et al.*, (78). Infatti, come abbiamo precedentemente sottolineato, numerosi studi e ring-test hanno dimostrato che tale metodologia non fornisce dati accurati e paragonabili, e per alcuni alimenti sottostimano il contenuto e quindi determinano errori nella valutazione.

In Italia l'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN) ha condotto due indagini sui Consumi nel periodo 1980-1984 e nel periodo 1994-1996, (79,80). La tecnica del "market basket" utilizzata per la ricostituzione della dieta italiana è considerata tra le migliori per monitorare gli introiti medi dei nutrienti e per valutare l'adeguatezza di una dieta ai livelli di ingestione giornaliera raccomandati (81).

L'introito giornaliero in folati, determinato direttamente sulla dieta ricostituita in laboratorio e relativo all'ultima indagine, è stato stimato intorno ai 213 mcg/pro capite/die (Ruggeri *et al.*, dati non pubblicati). Tali valori soddisfano il fabbisogno giornaliero per l'acido folico indicato nei LARN (1996) pari a 200 mcg/pro capite/die. Vegetali e frutta rappresentano la principale fonte di folati nella dieta italiana (37%), seguiti dai cereali che contribuiscono per un 29% all'introito giornaliero in folati. Latte e derivati rappresentano la terza fonte di folati apportati con la dieta (Ruggeri *et al.*, dati non pubblicati).

Va comunque ricordato che la copertura della raccomandazione stimata da questo studio riguarda la popolazione adulta e che in particolari stati fisiologici come la gravidanza e

l'allattamento è richiesto un incremento dell'introito giornaliero come acido folico sintetico (la forma in grado di ridurre l'incidenza delle malattie congenite).

I livelli di ingestione medi di folati in alcuni paesi europei variano tra 217-325 mcg/pro capite/die (82). Alcuni di questi valori – così elevati rispetto a quelli della dieta italiana, che dovrebbe essere caratterizzata da un maggior consumo di alimenti ricchi in folati rispetto ad alcuni paesi del Nord-Europa – sono in parte da attribuirsi alla metodologia di indagine utilizzata, e anche al consumo più elevato in questi paesi di alimenti fortificati con acido folico, quasi del tutto assenti nella nostra dieta.

Attualmente l'INRAN sta conducendo una nuova indagine sui consumi ai fini di un aggiornamento della conoscenza delle nostre abitudini alimentari e della valutazione dell'adeguatezza nutrizionale della dieta italiana.

Il calcolo dei livelli medi di ingestione, ottenuto da questionari alimentari o da diete ricostituite, deve essere confrontato con la valutazione dello stato di nutrizione per i folati attraverso lo studio di parametri biochimici come la valutazione dei livelli dei folati eritrocitari e plasmatici, i livelli di omocisteinemia plasmatica. In Italia per ora gli studi sullo stato di nutrizione per i folati sono limitati e rappresentativi solo di alcuni gruppi di popolazione (83).

Bibliografia

1. Mitchell H K, Snell EE, Williams RJ. The concentration of folic acid. *J Am Chem Soc* 1941;63:2284-2284.
2. Wills SL. Treatment of "pernicious anaemia" of pregnancy and tropical anaemia. *Br Med J* 1941;1059-1064.
3. Day PL, Langstone WC and Darby WJ. Folate of nicotinic acid to prevent nutritional cytopenia in the monkey. *Proc Soc Exp Biol Med* 1938;38:860-863.
4. Stockstad ELR Some properties of a growth factor for *Lactobacillus casei*. *J Biol Chem* 1943;149:573-574.
5. Stockstad ELR, Hutchings BL, Mowat JH, Boothe JH, Waller CW, Angier RB, Semb J and SubbaRow Y. The degradation of the fermentation *L. casei* factor. *J Am Chem Soc.* 1948;70:5-9.
6. Pfiffner JJ, Calkins DG, Bloom ES and O'Dell BL. On the peptide nature of vitamin Bc conjugate from yeast. *J Am Chem Soc* 1946;68:1392.
7. Pfiffner JJ, Calkins DG, O'Dell BL, Bloom ES, Brown RA, Campbell CJ and Bird OD. Isolation of antianaemia (vitamin Bc conjugate) in crystalline form from yeast. *Science.* 1945;102:2644-2648.
8. Bird OD and Robbins M. The response of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus faecalis* to vitamin Bc and Bc conjugate. *Biol Chem* 1946;63:661-665.
9. Mastropaolo D, Camerman A and Camerman N. Folic acid: crystal structure and implications for enzyme binding. *Science* 1980;210 (4467):334-336.
10. Feeney J, Albrand JP, Boicelli CA, Charlton PA and Young DW. Conformational studies on 5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (folinic acid) using ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance measurements: two interconverting conformations. *J Chem Soc Perkin Trans* 1980;II:176-185.
11. Chandler C.J, Wang TT, Halsted CH. Pteroylpolyglutammate hydrolase from human jejunal brush borders: purification and characterization. *J Biol Chem* 1986;261:928-933.
12. Bhandari SD, Gregory JF. Inhibition by selected food components of human and porcine intestinal pteroylpolyglutammate hydrolase activity. *Am J Clin Nutr* 1990;51:87.
13. Halsted CH. Intestinal absorption of dietary folates. In: *Folic acid Metabolism in Health and Disease*. Picciano MF, Stockstad ELR and Gregory JF (eds). Wiley-Liss: New York, 1990;23-45.

14. Kelly P, Mc Partlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM. Unmetabolized folic acid in serum:acute studies in subject consuming fortified food food and supplements. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1790-1795.
15. Gregory JF. The bioavailability of folate. In:Folate in Health and Disease. ed LB Bailey New York. Marcel Dekker Inc,1995;195-236.
16. Youinou P, Garre MA, Menez JF, Bales JM, Marin JF, Pennec Y, Miossec PJ, Morin PP, le Menn G. Folic acid and neutrophil dysfunction. *Am J Med* 1982;73 (5):652-657.
17. Steinberg SE, Campbell CI, Hillman Rs. The role of the enterohepatic cycle in folate supply to tumor in rats. *Br J Haematol* 1982;50(2):309-316.
18. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects:Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-137.
19. Czeizel AE & Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-1835.
20. Berry RJ, Erickson JD, Li S, Moare CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY.C, Gindler J, Hong SX, Correa A. Prevention of neural tube defects with folic acid in China. *N Eng J Med* 1999;341(20):1485-1490.
21. Clarke R and Homocysteine Lowering Trialist Collaboration. Lowering Blood Homocysteine with folic acid based supplements:meta analysis of randomised trials. *Br Med J* 1998, 316:894-898.
22. Ward M, McNulty H, McPartlin J, Strain IJ, Weir DG and Scott JM. Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease is lowered by physiological dose of folic acid. *Q J Med* 1997;90, 519-524.
23. Bunout D, Garrido A, Suazo M, Paz Venegas MD et al. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition* 2000;16(2):107-110.
24. Riddell LJ, Chisholm A, Williams S, Mann J. Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr*, 2000;71:1448-1454.
25. Rammersaud GC, Bailey LB, Kauwell PA. Relationship of folate to colonrectal and cervical cancer:review and recommendations for presctitioners. *J Am Diet Assoc* 2002;102:1273-1282.
26. Bollheimer LC, Buettner R, Kullmann A, Kullmann F. Folate and its preventive potential in colonrecatal carcinogenesis:How strong is the biological and epidemiological evidence? *Crit Rev Onc/Haem* 2005;55:13-36.
27. Weir DG and Molloy AM. Microvascular disease and dementia in the elderly:are related to hyperomocysteinemia? *Am J Clin Nutr* 2000;71(4):859-860.
28. Hawkes JG, Villota R. Folates in food:reactivity, stability during processing and nutritional implications. *Crit Rev Food Sci and Nutr* 1989;28(6):439-538.
29. Tamura T, Shin YS, Williams MA, Stokstad ELR. *Lactobacillus casei* response to pteroylpolyglutammates. *Anal Bioch* 1972;49:517.
30. Phillips DR, Wright AJA. Studies on the response of *Lactobacillus casei* to folate vitamin in food. *Br J Nutr* 1983;49:181-186.
31. De Souza SC, Eitenmiller RR. Effects of different enzyme treatments on extraction of total folate from various foods prior to microbiological assay and radioassay. *J Micronutr Anal* 1990;7:37-57.
32. Martin JI, Landen WO, Soliman AGM. Application of a Try-Enzyme extraction for total folate determination in foods. *J Assoc Off Anal Chem* 1990;73. 805-808.
33. Tamura T, Mizuno Y, Johnston KE, Jacob RA. Food folate assay with protease, α -amylase, and folate conjugase treatments. *J Agric Food Chem* 1997;45:135-139.
34. Rader JI, Weaver CM, Angyal G. Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chem* 1998;62(4):451-465.

35. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis: optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J Nutr Sc Vitaminol* 1998;44(3):961-970.
36. Ruggeri S, Aguzzi A, Carnovale E. Adequacy of trienzyme treatment in determination of folate in food. In "First International Conference on Foliates: analysis, bioavailability and health, 11-14 February 2004, Warsaw, Poland, pag 27-32.
37. AACC method 86-47. Total folate in Cereal Product- Microbiological assay Using Trienzyme Extraction, appr. November 2000. *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*, 10th ed. The Association St. Paul, MN, 2000.
38. Finglas PM, Faure U, Southgate DAT. First BCR-intercomparison on the determination of folates in food. *Food Chem* 1993;46:199-213.
39. Finglas PM, Wigertz K, Vahteristo L, Witthoft C, Southon S, de Froidmont-Gortz I. Standardization of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. *Food Chem* 1999;64(2):245-255.
40. Shrestha AK, Arcot A, Paterson J. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. *Food Chem* 2000;71(4):545-552.
41. O'Broin S, Kelleher B. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. *J Clin Pathol* 1992;45(4):344-347.
42. Selhub J. Determination of tissue folate composition by affinity chromatography followed by high-pressure ion pair liquid chromatography. *Anal Biochem* 1989;182:84-93.
43. Vahteristo L, Ollilainen V, Koivistoinen PE, Varo P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. *J Agri Food Chem* 1996;44:477.
44. Vahteristo L, Ollilainen V, Varo P. Liquid chromatography determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dietary products consumed in Finland. *JAOAC Int* 1997;80(2):373-378.
45. Pfeiffer CM, Rogers LM, Gregory JF. Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. *J Agri Food Chem* 1997;45:407-413.
46. Ruggeri S, Vahteristo LT, Aguzzi A, Finglas P, Carnovale E. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography". *J Chrom A* 1999;855:237-245.
47. Jastrebova J, Witthoft C, Grahn A, Svensson , Jagerstad M. HPLC determination of folates in raw and processed beetroot. *Food Chem* 2003;80(4):579-588.
48. Seyoum E & Selhub J. Combined affinity and ion pair column chromatographies for the analysis of food folate. *J Nutr Biochem* 1993;4:488-494.
49. Kariluoto S, Vahteristo L, Piironen V. Applicability of microbiological assay and affinity chromatographic purification followed by high performance liquid chromatography in studying folate contents in rye. *J Sci Food Agric* 2001;81:1-5
50. Rader JI, Weaver CM, Angyal G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. *Food Chem* 2000;70:275.
51. Wigertz K, Svensson UK, Jagerstad M. Folate and folate-binding protein content in dairy products. *J Dairy Res* 1997;64:239-252.
52. Witthöft C, Forssen K, Johannesson L, Jägerstad M. Foliates-food sources, analyses, retention and bioavailability. *Scand J Nutr* 1999;43:138-146.
53. Picciano MF, West SG, Ruch AL, Kris-Etherton PM, Zhao G, Johnston KE, Maddox DH, Fishell VK, Dirienzo DB, Tamura T. Effect of cow milk on food folate bioavailability in young women. *Am. J. Clin Nutr* 2004;80(6):1565-1569.

54. McKillop DJ, Pentieva C, Daly D, Mc Partlin J, Hughes J, Strain JJ, Scott JM, McNulty H. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br J Nutr* 2002;88(6):681-688.
55. Jackson MJ. The assessment of bioavailability of micronutrients:Introduction. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:S1-S2.
56. Brouwer IA, van Dusseldorp, M, West, CE, & Steegers-Theunissen. RPM. Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutrition Research Review* 2001;14:267-293.
57. Verwei M, Arkabage K, Havenaar R, van den Berg H, Witthoft C & Schaafsma. Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J Nutr* 2003;133(7):2377-2388.
58. De Pee S & West CE. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency:A review of the literature. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:S38-S53.
59. Tamura T & Stockstad ELR. The availability of food folate in man. *Brit J of Haem* 1973;25:513-532.
60. Abad AR , Gregory JF. Determination of folate bioavailability with a rat bioassay. *J Nutr* 1987;117(5):866-873.
61. Clifford, AJ, Heid Mk, Peerson JM, Bills ND. Bioavailability of food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay. *J Nutr* 1991;121(4):445-453.
62. Gregory JF. Bioavailability of folate. *Eur J Clin. Nutr* 1997;61:S55-S59.
63. Sauberlich HE, Kretsch MI Skala JH, Johnson HL & Taylor PC. Folate requirement and metabolism in non-pregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987;46:1016-1028.
64. Cuskelly GI, McNulty H and Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate:implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* 1996;347:657-659.
65. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory J.F .Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1388-1397.
66. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West EC, Meyboom S, Thomas CMG, Duran M, et al. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr* 1999;129:1135-1139.
67. Riddel LJ, Chisholm A, Williams S & Maan JI. Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1448-1454.
68. Gregory JF, Quilnivan EO and Davis SR. Integrating the issue of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification.. *Trends in Food Scien & Tech* 2005;16:229-240.
69. Institute of Medicine - National Academy of Sciences, 1998:“*Dietary References Intakes:thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline*”. A report of the Standing Committee of the Scientific evaluation of dietary reference intakes and its panel on folate, other B-vitamins and choline and Sub-Committee on upper reference levels in nutrients. Food and Nutrition Board, Institute of Medecine. Washington DC:National Accademy Press;196-305
70. Sanderson P, McNulty H, Mastroiacovo P, Mc Dowell IFW, Melse- Boonstra A, Finglas PM, et al,. Folate bioavailability:UK Food Standards Agency workshop report. *British J Nutr* 2003;90:473-479.
71. Sichert-Hellert W, Kerrsting M. Fortifying food with folic acid improves folate intake in German infants, children and adolescents. *J Nutr* 2004;134 (10). 2685-2690.
72. Drogan D, Grobususch K, Diekes J, Welkert C, Boeing H. Dietary intake of folate equivalents and risk of myocardial infarction in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Postam study. *Public Health Nutr*, 2006;9 (4):465-471.
73. Engelhardt R, Gregory JF. Adequacy of enzymatic deconjugation in quantification of folate in foods. *J Agric Food Chem* 1990;38:154-158.

74. Tamura T. Determination of food folate. *J Nutr Bioch* 1998;9(5):285-293.
75. USDA, Nutrient Data Laboratory .USA Department of Agriculture Nutrient Database for Standard Reference (release 18).
76. McCance and Widdowson's "The Composition of Foods". 2002 Food Standard Agency. Royal Society of Chemistry 6^h Edition
77. Kariluoto S, Vahteristo LT, Finglas PM, De Meer K, Nau H, Kehlenbach U. Population estimates of folate intake from food analyses. *Am J Clin Nutr* 2002;76 (3):689-690.
78. Konings EJM, Roomans HHS, Dorant E, Goldbohm RA, Saris WHM, van den Brandt PA. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *Am J Clin Nutr* 2001;73:765-776.
79. Turrini A, Saba A, and Lintas C. Study of the Italian reference diet for monitoring food constituents and contaminants. *Nutr Res* 1991;11:861-874.
80. Turrini A, Lombardi Boccia G. The formulation of the market basket of the Italian Total Diet 1994-1996. *Nutr Res* 2002;22:1151-1154.
81. Pennington JAT. Revision of the total diet study food list and diets. *J Am Diet Ass* 1983;82(2):166-173.
82. Finglas P 2001. Report on "Folate from food to functionality and optimal health"(QLRT-1999-00576). Institute of Food Research, Norwich.UK.
83. Carnovale E. Assunzione di folati nella dieta italiana, In:Interazioni geni e ambiente:folati e malformazioni congenite. A cura di Mantovani A, Taruscio D, Stazi AV. Rapporto ISTISAN 02/26-ISS. 2002;pag 3-12.
84. Ruggeri S. Folate from food. Four is enough ... choosing right. *Nutrition Bulletin*, 2004;29 (4):356-358.
85. Forseen KM, Jagerstad MI, Wigetzk, Witthoft CM. Folate and dairy products:a critical update:*J Am Coll Nutr* 2000;19 (2Suppl):100S-110S.
86. Kariluoto S, Vahteristo L, Salovaara H, Katina K, Liukkonen KE and Pironen V. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Cereal Chem* 2004;81(1):134-139.
87. Osseyi ES, Wehling RL and Albrecht JA HPLC determination and stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. *Cereal Chem* 2001;78(4):375-378.

Livelli di assunzione raccomandati di folati

La raccomandazione nutrizionale di folati si è evoluta nel corso degli anni rispondendo alle nuove conoscenze che si sono acquisite sul ruolo di questo nutriente nella salute umana e sul significato degli indicatori di stato nutrizionale ad esso relativi. La commissione congiunta FAO/OMS del 1988 definì tre livelli di stato di nutrizione relativo ai folati: adeguatezza, carenza marginale, carenza manifesta. La commissione mise in evidenza il fatto che una indicazione di salute pubblica tesa all'incremento della assunzione di folati era giustificata solo nelle situazioni di carenza marginale o nei casi di carenza grave, in cui le strategie di intervento dovevano essere improntate al tamponamento rapido in tempi brevi, mentre non è giustificato un intervento dietetico sulla popolazione in generale (FAO/WHO; 1988). In questo contesto vennero definiti anche gli indicatori biochimici relativi allo stato di nutrizione per i folati, tra cui quello ritenuto più attendibile era considerato il livello eritrocitario dei folati (folatemia), che in un soggetto non carente deve essere superiore a 150µg/L. Il test suggerito per la determinazione della folatemia era l'N-formino-1-glutamato anche se questa procedura analitica è stata fortemente criticata e attualmente abbandonata in quanto ritenuta non affidabile (Chanarin,

1979). Per contro la concentrazione eritrocitaria di folati continua ad essere considerato un indice importante per la valutazione dello stato di nutrizione per i folati (Sauberlich, 1995); l'altro indice che può essere utilizzato è la concentrazione plasmatica di acido folico che, però, è soggetta a maggiori fluttuazioni. I parametri ematologici classici come il volume corpuscolare medio, l'ipersegmentazione dei neutrofili, e, in caso, le prime avvisaglie di una anemia, sono importanti indicatori indiretti di uno stato nutrizionale limitante relativamente ai folati (Lindenbaum *et al*, 1990).

Le raccomandazioni dell'88 sono alla base delle raccomandazioni elaborate dagli esperti della Commissione Europea del 1993 (*Commission of the European Communities*, 1993) e che sono state riprese nella elaborazione dei Livelli di Assunzione Raccomandati per l'energia e i Nutrienti italiani (LARN) (Società Italiana di Nutrizione Umana, 1996). Nella Tabella 7 viene riportata la raccomandazione di assunzione di acido folico attualmente in vigore e che appare essere abbastanza datata. Infatti i LARN italiani sono in corso di aggiornamento; la revisione delle raccomandazioni relative all'acido folico sarà ovviamente basata sui dati più recenti e sui documenti in consenso elaborati dalle commissioni di esperti internazionali.

Tabella 7. Livelli di assunzione giornaliera raccomandati (LARN) per gruppo di età e stato fisiologico (SINU, 1996)

Gruppo di popolazione	LARN (µg/die)
6-12 mesi	50
1-3 anni	100
4-6 anni	130
7-10 anni	150
Maschi	
11-14 anni	180
15-17 anni	200
18-29 anni	200
30-59 anni	200
60+	200
Femmine	
11-14 anni	180
15-17 anni	200
18-29 anni	200
50+	200
Gestanti	400
Nutrici	350

Dai lavori della commissione FAO/OMS dall'88 ad oggi si sono accumulate evidenze sperimentali ed epidemiologiche che hanno portato ad una riconsiderazione delle raccomandazioni relative a questo nutriente. Innanzi tutto il fatto che la nutrizione non è più vista solo come il mezzo per coprire i fabbisogni ma anche in quanto strategia preventiva nei confronti delle patologie a componente alimentare. In questa ottica si innesca la problematica dell'uso degli indicatori biochimici per la valutazione della adeguatezza nutrizionale per l'acido folico, di cui la folatemia è solo uno. Infatti, più recentemente, alla lista dei possibili indicatori di adeguatezza dello stato di nutrizione per i folati, è stata aggiunta la concentrazione plasmatica di omocisteina che è negativamente correlata con la assunzione di acido folico (Selhub *et al*, 1993). L'interesse nei confronti della omocisteina plasmatica nasce dal fatto che è ormai consensuale che una elevata omocisteinemia è un fattore di rischio indipendente per le malattie cardiovascolari (Boushey *et al*, 1995; Perry *et al*, 1995; Wald *et al*, 1998), per cui una elevata concentrazione plasmatica di omocisteina è sempre un evento non desiderabile. I valori di

adeguatezza per i folati raccomandati dalla commissione FAO/OMS (1988) sono correlati con elevata omocistinemia sia nell'intervallo di normalità che in quello di carenza (Saubertlich, 1995) e quindi di fatto possono essere associati ad un aumentato rischio per le malattie cerebro- e cardio- vascolari (Perry *et al*, 1995). Nella considerazione della adeguatezza della assunzione di acido folico bisogna quindi tenere presente non solo la concentrazione eritrocitaria di folato ma anche il fatto che l'acido folico della dieta sia sufficiente a tenere la omocisteina plasmatica al disotto delle $7\mu\text{mol/L}$.

L'altra area di grande sviluppo delle conoscenze dei rapporti tra folati e salute è quella relativa alle evidenze, oramai conclusive, che si sono accumulate sulla azione preventiva di una adeguata assunzione questo nutriente in epoca periconcezionale quale strategia di salute pubblica per prevenire la insorgenza dei difetti del tubo neurale (Wald *et al*, 1998; Scott *et al*, 1994). È dimostrato che i livelli eritrocitari di folato considerati adeguati nelle conclusioni della commissione FAO/OMS dell'88, sono associati ad un aumentato rischio di insorgenza della spina bifida e di altri difetti del tubo neurale (Kirke *et al*, 1993). La concentrazione eritrocitaria di folati pari a 150 mg/L pur essendo completamente adeguata per la prevenzione della anemia, è tuttavia associata con un aumentato rischio di insorgenza dei difetti del tubo neurale (Daly *et al*, 1995). Inoltre uno stato nutrizionale carente per l'acido folico è associato con un incrementato rischio di insorgenza di cancro del colon-retto (Mason, 1995; Kim *et al*, 1998), anche se i soggetti non erano folato-deficienti in senso clinico convenzionale.

Nel 1998, la Accademia delle Scienze Statunitense (NAS, *National Academy of Sciences*) ha effettuato un grosso lavoro di revisione e raccolta di tutte le nuove evidenze scientifiche relative alla assunzione di folato, allo stato di nutrizione ad esso relativo, alle sue relazioni con la salute in tutte le fasce di età e nei diversi stati fisiologici, inclusi gravidanza e allattamento (*Food and Nutrition Board*, 1998). Sulla base di questa revisione è stata stimato il fabbisogno medio (*Estimated Average Requirements*, EARs) e la assunzione dietetica raccomandata (*Recommended Dietary Allowances*, RDAs), calcolata a partire dal fabbisogno medio a cui vengono aggiunte le 2 deviazioni standard di variabilità in modo da coprire i fabbisogni di quasi tutta la popolazione sana (97,5%). Nella Tabella 8 sono riportati i fabbisogni medi stimati e la corrispondente assunzione dietetica raccomandata per l'acido folico per vari gruppi di età e per differenti stati fisiologici.

Tabella 8. Stima dei fabbisogni medi (EARs) e assunzione dietetica raccomandata (RDAs) per l'acido folico espressa come folati dietetici equivalenti, per gruppo di età o stato fisiologico (WHO/FAO; 2004)

Gruppo di popolazione	EAR ($\mu\text{g}/\text{die}$)	RDA ($\mu\text{g}/\text{die}$)
Neonati e bambini		
0-6 mesi ^a	65	80
7-12 mesi	65	80
1-3 anni	120	150
4-6 anni	160	200
7-9 anni	250	300
Adolescenti		
10-18 anni	330	400
Adulti		
19-65 anni	320	400
65+ anni	320	400
Gestanti	520	600
Nutrici	450	500

a Derivato dalla assunzione di $0,75\text{ l}/\text{die}$ di latte materno (adattato da Food and Nutrition Board, 1998).

Tali valori sono quelli pubblicati nel documento di consenso OMS/FAO (2004) sui fabbisogni di vitamine e minerali per la nutrizione umana che riprende i valori pubblicati dal NAS (1998), ritenendoli la migliore stima per i fabbisogni di folato disponibile in letteratura e li adotta quale propria raccomandazione.

Considerazioni relative alle raccomandazioni dietetiche di folato

Questi aspetti sono trattati diffusamente in altre parti di questo volume. In questa sede basterà riportare quanto emerge dai documenti di consenso internazionali elaborati recentemente su queste tematiche (WHO/FAO, 2004). C'è oramai un largo consenso nella letteratura scientifica sulla importanza della supplementazione dietetica di acido folico in gravidanza quale strategia preventiva nei confronti della insorgenza dei difetti del tubo neurale. Infatti i fabbisogni di acido folico in gravidanza sono talmente elevati (Tabella 1) che è impossibile ottenerli con la sola dieta. Nelle aree in cui si effettua la fortificazione di alimenti di largo consumo, si tende a mantenere il livello di fortificazione a livelli non superiori ai 100µg/die. Infatti, mentre la supplementazione delle donne in gravidanza e allattamento è una strategia di salute pubblica mirata ad un gruppo specifico di popolazione in uno stato fisiologico particolare, la fortificazione è destinata alla intera popolazione che non può essere esposta ad elevate dosi di folato, perché si corre il rischio di mascherare la presenza di anemia perniciosa soprattutto negli anziani (WHO/FAO, 2004). Un'altra area importante dal punto di vista della prevenzione è quella relativa alle malattie cardiovascolari. La omocisteina plasmatica, anche se moderatamente elevata è un fattore di rischio indipendente per le malattie cardiovascolari (Scott & Weir, 1996; Wald *et al*, 1998; Boushey *et al*, 1995) e per l'ictus (Perry *et al*, 1995). Un aumento del rischio è associato con omocistinemia superiore a 11µmol/L (Wald *et al*, 1998), valore assolutamente nell'intervallo di normalità (5-15 µmol/L) della concentrazione plasmatica di omocisteina (Refsum *et al*, 1998). Anche in popolazioni in cui la assunzione dietetica di acido folico è adeguata, si osserva una certa quota di incremento dei livelli plasmatici di omocisteina (Saublich, 1995) che può essere abbassata con il consumo addizionale di 100 o 200µg/die di acido folico (Wald *et al*, 1998; Refsum *et al*, 1998). Trial clinici su ampia scala non sono stati ancora completati e quindi il significato delle relazioni tra assunzione dietetica di acido folico, livelli plasmatici di omocisteina e malattie cardiovascolari non sono state sufficientemente chiarite per cui al momento è prematuro introdurre una misura di salute pubblica in tal senso (OMS/FAO, 2004). Gli studi scientifici che mettono in relazione la presenza del cancro colonrettale con la assunzione dietetica di folati e lo stato di folatemia sono sempre più comuni (Mason, 1995; Kim *et al*, 1998). Si riporta in particolare uno studio che ha dimostrato che la assunzione prolungata di supplementi multivitaminici contenenti acido folico in un gruppo di donne determinava una riduzione del rischio di insorgenza di cancro del colon-retto (Giovannucci *et al*, 1998). Al momento tuttavia le evidenze scientifiche su questo argomento sono troppo limitate e preliminari per una raccomandazione di incremento di assunzione di acido folico quale strategia preventiva per il cancro del colon-retto (WHO/FAO; 2004).

Carenza

L'insufficiente apporto di folati porta nell'uomo ad una riduzione della sintesi di DNA e RNA, con conseguente insorgenza di manifestazioni assai gravi a carico di cellule a rapido turnover come quelle del midollo osseo, causando così la anemia megaloblastica. La carenza di acido folico ha un impatto diverso a seconda dell'età e dello stato fisiologico nella quale si manifesta. Carenze dietetiche di folato sono comuni in popolazioni in cui c'è malnutrizione

(Chanarin, 1979). In aree in cui la assunzione alimentare è adeguata, le condizioni di malassorbimento patologico, quali la malattia celiaca o la sprue tropicale, sono associate a carenza di acido folico. Le donne in gravidanza sono un gruppo a rischio per la carenza di folato perché in gravidanza i fabbisogni di questo nutriente sono di molto aumentati, specialmente durante i periodi di rapida crescita fetale (ad esempio nel secondo e terzo trimestre di gravidanza) (McPartlin *et al*, 1993). Anche l'allattamento è un altro periodo critico perché le perdite di acido folico nel latte materno incrementano i fabbisogni della nutrice.

– *Adulti*

Negli adulti, la carenza di acido folico può manifestarsi con l'insorgenza di una sintomatologia caratterizzata da astenia, pallore, glossite, irritabilità, diarrea, disturbi del sonno, tutti sintomi legati alla evidenza clinica più rilevante e caratteristica della carenza di acido folico che è la anemia megaloblastica. Il sistema emopoietico infatti, è particolarmente sensibile alla carenza di questo micronutriente. L'anomalia biochimica si traduce a livello cellulare in una disparità tra sintesi degli acidi ribonucleici e dell'emoglobina che procedono regolarmente, e sintesi del DNA, che è rallentata. Le cellule, che presentano pertanto una maturazione citoplasmatica normale e una nucleare alterata, assumono così un aspetto megaloblastico e, a causa della loro fragilità, vanno spesso incontro a lisi intramidollare. Inoltre, la carenza di acido folico è spesso associata a carenze di altri micronutrienti (zinco, vitamina B₁₂) che sono, a loro volta, ulteriori fattori di rischio teratogeno.

– *Infanzia*

Anche nell'infanzia, la carenza di acido folico, dovuta ad insufficiente assorbimento, può essere causa di anemia megaloblastica. Solitamente il deficit dietetico si manifesta in corso di una rapida crescita o di uno stato infettivo, condizioni che possono entrambe fare innalzare il fabbisogno di acido folico. Il picco di incidenza è intorno a 4-7 mesi di vita, un po' prima rispetto all'anemia da carenza di ferro, anche se le due forme possono essere presenti contemporaneamente nei bambini malnutriti. Si osserva anemia macrocitica spesso associata a variazioni nella forma e dimensioni degli eritrociti. Malattie infiammatorie o degenerative dell'intestino (tra cui malattia celiaca, enterite cronica, malattia di Crohn, fistole enteroenteriche) possono inoltre essere causa di deficit di acido folico.

– *Gravidanza*

Durante la gravidanza il fabbisogno giornaliero di acido folico aumenta. Tale incremento è dovuto sia alle maggiori richieste materne (accelerata eritropoiesi) sia alle eccezionali richieste fetali (tessuti in rapida crescita). L'incidenza dei deficit di folati durante la gestazione varia con la popolazione studiata in relazione alle abitudini alimentari, all'impiego dei contraccettivi orali (che potrebbero determinare un'ipofolatemica da ridotto assorbimento), alla presenza nella popolazione di soggetti con "trait talassemico" cronicamente ipofolatemici per aumento del fabbisogno conseguente all'accelerata eritropoiesi.

– *Allattamento*

L'acido folico è contenuto in concentrazioni elevate nel latte materno con cui quindi si può coprire molto bene il fabbisogno giornaliero del lattante. Diversi autori (Salmenpera *et al*, 1986) hanno evidenziato come i livelli di acido folico risultino essere assolutamente ottimali nei bambini allattati esclusivamente al seno (nei quali esiste ed è stata dimostrata una precisa correlazione tra durata dell'allattamento al seno e concentrazione plasmatica di folati) ma inadeguati in quelli allattati con formule adattate non adeguatamente arricchite. Uno studio (Olivares *et al*, 1989) ha inoltre dimostrato come in un gruppo di

112 bambini allattati al seno, a 4, 6 e 9 mesi di vita fossero evidenziabili concentrazioni plasmatiche di folato significativamente più elevate che in un secondo gruppo di 102 bambini divezzati prima dei 5 mesi. A 6 mesi di età la prevalenza di deficit di acido folico era pari a 0% nel primo gruppo e a 15,4 % nel secondo gruppo; a 9 mesi le percentuali passavano al 3,6 % contro il 28,9 %. In generale va detto che i livelli di folati nel latte materno sono mantenuti alti nel corso dell'allattamento a spese delle riserve materne e che quindi la supplementazione di acido folico durante la gravidanza e l'allattamento risulta essere assolutamente necessaria anche al fine di preservare le preziose riserve materne.

Rischi di tossicità

Apporti di folati fino a 5 mg/die sembrano tollerati senza effetti collaterali. Apporti elevati di folati hanno però l'effetto di mascherare un'eventuale carenza di vitamina B₁₂. Poiché tale carenza può avere effetti neurologici irreversibili, si consiglia di evitare eccessive supplementazioni di folati, in particolare nei vegetariani e negli anziani che sono particolarmente a rischio di carenza di B₁₂.

Non sono descritti in letteratura casi di intossicazione da eccesso di ingestione di folati da fonti alimentari (Butterworth & Tamura, 1989). Eventi tossici sono legati alla assunzione di composti sintetici anche se le tipologie che hanno dato problemi sono le preparazioni terapeutiche utilizzate per il trattamento dei pazienti affetti da turbe neuropsichiatriche e/o nei trattamenti salva-vita dei pazienti affetti da cancro trattati con agenti antitumorali e non le forme di folato sintetico utilizzate per la fortificazione degli alimenti.

In letteratura non è disponibile una valutazione tossicologica sistematica dei folati di sintesi. Tuttavia sono registrati gli effetti avversi conseguenti ad un eccesso di ingestione di acido folico. Sulla base di questi studi sono stati identificati i punti più importanti relativi alla sicurezza d'uso della supplementazione/fortificazione con acido folico, che vengono di seguito riportati:

- effetto confondente sulla sintomatologia della carenza di vitamina B₁₂ (anemia perniciosa) conseguente alla supplementazione con acido folico che può determinare sia il mascheramento di sintomi ematologici che il peggioramento dei sintomi neurologici;
- effetti di induzione di crisi epilettiche e altri effetti neurotossici;
- diminuzione della efficacia degli antagonisti dei folati utilizzati nella chemioterapia;
- potenziali effetti avversi della supplementazione con folati sull'assorbimento dello zinco e sullo stato nutrizionale ad esso correlato;
- carcinogenicità;
- presunta ipersensibilità all'acido folico.

Tutti questi aspetti sono stati ampiamente esaminati e sono stati oggetto di specifica letteratura scientifica (Butterworth & Tamura, 1989; Campbell, 1996; Dickinson, 1995). Inoltre i dati sulla tossicità dell'acido folico sono stati ampiamente analizzati e rivisti dalla Food and Drug Administration (FDA, 1993) prima della decisione di rendere obbligatoria la fortificazione della farina di frumento quale strategia preventiva nei confronti della insorgenza dei difetti del tubo neurale.

Alterazioni della sintomatologia da carenza di vitamina B₁₂

L'acido folico e la vitamina B₁₂ sono vitamine fortemente interconnesse essendo entrambe coinvolte nel processo di rimetilazione della omocisteina a metionina. La carenza di vitamina B₁₂ in definitiva risulta in una carenza parziale o secondaria di folati, che in quanto presenti

nella forma 5-metil-tetraidrofolati non risultano disponibili per la formazione della molecola coenzimantica responsabile della formazione della base azotata timina necessaria per la sintesi del DNA. Sia nella carenza di acido folico che in quella di vitamina B₁₂, sopravvengono cambiamenti megaloblastici a carico del midollo osseo per effetto di una compromissione della sintesi del DNA. Supplementando con acido folico un soggetto carente di vitamina B₁₂ si può avere una “rinnovata disponibilità” di substrato per la sintesi di DNA e una remissione di sintomi ematologici. Invece le complicanze neurologiche della carenza di B₁₂ non rispondono alla supplementazione con acido folico. In passato, quando la vitamina B₁₂ non era stata ancora identificata come una vitamina distinta dall’acido folico, la macrocitosi e gli altri sintomi ematologici venivano trattati con alte dosi di folati (>5mg/die). Con questo protocollo terapeutico nella maggior parte dei casi (>60%) si osservava la completa remissione della sintomatologia ematologica. A dosaggi più bassi (1-5mg/die) si osservava un miglioramento parziale; in effetti anche dosaggi molto bassi (<1mg) somministrati per via intramuscolare davano una qualche risposta di attenuazione della sintomatologia ematologica, anche se limitatamente a pochi casi (Butterworth & Tamura, 1989; Bower & Wald, 1995; FDA, 1993).

Bisogna comunque considerare che i disturbi a carico del sistema ematico non comparivano in tutti i pazienti con anemia perniziosa; infatti vi sono gruppi di pazienti nei quali venivano osservati solo sintomi neurologici. La quota di pazienti in cui la carenza di vitamina B₁₂ determina solo anomalie neurologiche senza compromettere i normali test ematologici di routine può essere stimata in un range compreso tra 11 e 33% (Campbell, 1996). In molti, ma non in tutti i pazienti con anemia perniziosa, la sintomatologia neurologica può essere legata ad una degenerazione del midollo spinale; in questi casi, contrariamente a quanto avviene per le anomalie ematologiche, non si osserva remissione della sintomatologia neurologica per effetto della supplementazione con acido folico. Benché ci siano stati molti studi che hanno mostrato che anche dosi molto elevate (10-100 mg/die) di acido folico somministrate per molti anni non erano responsabili della insorgenza di sintomatologia neurologica, in una certa fase dello studio delle relazioni causa-effetto, è emersa la ipotesi che la terapia con acido folico in pazienti con carenza di vitamina B₁₂, potesse aggravare o addirittura indurre le lesioni neurologiche (SCF, 2000). Tuttavia una attenta revisione della letteratura in tal senso (Dickinson, 1995) ha concluso che non ci sono prove convincenti di un effetto diretto della supplementazione con acido folico nella induzione o nell’aggravamento dei sintomi neurologici da carenza di vitamina B₁₂.

Effetti neurotossici dell’acido folico

In modelli animali l’acido folico può agire come una neurotossina, inducendo convulsioni in animali da laboratorio (SCF; 2000). Gli effetti neurotossici dell’acido folico sono basati su studi su modelli in vitro, cellulari e tissutali, e/o utilizzando dosaggi molto elevati (60-90mg). Non c’è ragione di supporre un effetto neurotossico dell’acido folico per l’uomo. Un’altra ipotesi emersa nella pratica clinica era legata al fatto che la supplementazione con acido folico potesse peggiorare l’entità delle crisi epilettiche in pazienti con epilessia, sia essa controllata attraverso la terapia farmacologica che senza tale supporto. Tuttavia gli studi controllati sull’argomento hanno mostrato che dosaggi di 15-20mg/die non avevano questo effetto nei pazienti epilettici e non si osservava una interferenza con la terapia anticonvulsiva (SCF, 2000).

Interferenza con il metabolismo dello zinco

Gli studi relativi alla interazione competitiva tra zinco e acido folico hanno dato risultati non univoci e in qualche caso contraddittori. Una approfondita revisione di questi esperimenti da parte di Butterworth & Tamura (1989) e di Zimmerman & Shane (1993), ha concluso che non ci sono sufficienti evidenze per avvalorare la ipotesi di un effetto negativo dei supplementi di

folati (10mg/die per 6 mesi) sul contenuto di zinco del siero e degli eritrociti, né di un effetto negativo della supplementazione con acido folico sullo stato nutrizionale per lo zinco nelle gestanti. La maggiore limitazione di questi studi è legata al fatto che la definizione dello stato nutrizionale per lo zinco attraverso i parametri ematologici non è ritenuta il sistema migliore per definire l'adeguatezza della assunzione di questo minerale.

Carcinogenicità

Elevate assunzioni di acido folico sono risultate associate con una aumentata incidenza di cancro (Selby *et al.*, 1989), anche se in questo tipo di associazioni epidemiologiche è difficile discriminare l'effetto di altri fattori confondenti, quali il fumo di sigaretta e il consumo di alcol, nella definizione delle relazioni di causa-effetto. Per contro altri studi osservazionali hanno mostrato delle relazioni inverse tra assunzione di folati e cancro del colon-retto (Giovanucci *et al.*, 1993; White *et al.*, 1997) e del cancro della cervice (Butterworth, 1993).

Diminuita efficacia dei folati antagonisti

La interferenza dei folati con alcuni trattamenti terapeutici è stata oggetto dei lavori della FDA (1993) prima dell'obbligo della messa in commercio delle farine fortificate negli USA. I folati antagonisti come il metotrexato, sono utilizzati nel trattamento di molti tipi di cancro, nella leucemia, nell'artrite reumatoide, nell'asma bronchiale e nella psoriasi. La FDA ha concluso che ci sono troppi pochi dati sulla interazione farmaci/folati per dare una specifica raccomandazione in materia.

Presunta ipersensibilità

Troppo pochi studi sono stati pubblicati su reazioni specifiche legate ad una ipersensibilità nei confronti di acido folico assunto per via orale o parenterale, ma non può essere escluso che tali reazioni possano avvenire anche se al momento sono un evento raro (Campbell, 1996).

Derivazione dei livelli massimi ammissibili

I dati disponibili in letteratura permettono di concludere che, se effetti avversi ci sono a seguito della ingestione di un eccesso di acido folico, essi possono essere attribuiti solo alla assunzione di folati sintetici; per contro non si registrano casi di intossicazione da eccesso di ingestione di acido folico da matrice alimentare. Dati su modello animale e dati su modelli in vitro (cellule e tessuti) indicano un effetto neurotossico e di induzione di crisi epilettiche a dosi molto elevate (60-90mg di acido folico); non è confermata la neurotossicità dei folati nell'uomo. L'effetto avverso più importante dell'acido folico è legato alle modificazioni neurologiche che possono essere indotte nei pazienti affetti da anemia perniciososa. In questi soggetti la supplementazione con acido folico maschera i segni ematologici e può determinare un peggioramento della progressione dei sintomi neurologici.

La alterazione dei parametri ematologici è molto frequente a dosi giornaliere di 5mg, mentre per dosi più basse (1-5mg/die) non si hanno dati sufficienti per stabilire una relazione di causa-effetto. Proprio questo effetto di mascherare i sintomi di carenza di vitamina B₁₂ è stato considerato il più importante fattore da tenere presente nella derivazione del livello massimo ammissibile (*Upper Level*, UL) di folati (FDA, 1993). Proprio per i dubbi relativi ai potenziali effetti avversi a dosi comprese tra 1-5mg/die e poiché elevate assunzioni di acido folico determinano la presenza di forme ossidate nel sangue, esponendo i tessuti ad una forma chimica della vitamina non fisiologica, l'UL è stato fissato a 1mg/die per quanto riguarda il folato totale

(dietetico + supplementi / fortificazione). Si è deciso considerare la assunzione totale di folati perché in tutti i trial clinici nei quali è stato valutato l'effetto di mascheramento dei sintomi da carenza di vitamina B₁₂ venivano somministrate entrambe le forme per cui non è possibile discriminare l'effetto dell'uno da quello dell'altro.

In un aggiornamento della revisione della FDA del 1993 effettuato dallo stesso Ente nel 1996, queste conclusioni vennero confermate e l'UL a 1mg di folati totali è stato mantenuto tal quale (FDA, 1996).

Più recentemente il comitato statunitense per le raccomandazioni dietetiche e il sottocomitato sui limiti massimi ammissibili di nutrienti (*US Committee Evaluating the New Dietary Reference intakes/Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients - FNB DRI Report*, 1998) ha concluso che più che la copertura dei sintomi ematologici, è da tenere in considerazione la progressione dei sintomi neurologici conseguenti alla supplementazione con acido folico nei soggetti carenti di vitamina B₁₂. Infatti la questione della copertura dei sintomi ematologici è un problema diagnostico che può essere aggirato utilizzando test specifici. Il comitato menzionato ha stabilito un LOAEL (*Lowest-Observed-Adverse-Effect Level*) di 5mg/die di acido folico e non è stato in grado di definire un NOAEL (*Non-Observed-Adverse-Effect Level*) lasciando l'UL a 1mg/die.

A livello europeo i lavori dello *Scientific Committee of Food* (SCF, 2000) riprendono queste posizioni che vengono mantenute tali. Nel documento dell'SCF viene considerato il fatto che non c'è ragione di supporre che determinati stati fisiologici possano essere particolarmente suscettibili a dosi elevate, per cui l'UL proposto viene ritenuto adeguato anche per le gestanti e le nutrici. In via prudenziale si suggerisce di aggiustare i valori di UL per i bambini tenendo conto delle ridotte dimensioni corporee. Nella Tabella 9 sono riportati i limiti massimi ammissibili di assunzione di acido folico per le diverse fasce di età e fasi fisiologiche così come proposti nel documento dell'SCF (2000).

Tabella 9. Livelli massimi ammissibili (UL) di assunzione dietetica giornaliera di acido folico per gruppo di età o stato fisiologico (SCF, 2000)

Gruppo di popolazione	UL (µg/die)
1-3 anni	200
4-6 anni	300
7-10 anni	400
11-14 anni	600
15-17 anni	800
18+	1000
Gestanti	1000
Nutrice	1000

Caratterizzazione del rischio

I soggetti a rischio in caso di assunzione di elevate dosi di acido folico sono coloro che hanno una carenza di vitamina B₁₂, con presenza di anemia perniziosa e altre condizioni patologiche legate a un malassorbimento di cobalamina, soprattutto se tale carenza non è diagnosticata. La prevalenza di anemia perniziosa in Europa occidentale varia tra 1,2 e 1,98 per 1000 abitanti. La insorgenza di anemia perniziosa ha un pattern legato alla età e alla etnia: nei caucasici è maggiormente comune negli anziani, mentre negli afro-americani è più comune negli individui giovani al disotto dei 40 anni di età. Inoltre basse concentrazioni plasmatiche di cobalamina, spesso asintomatiche dal punto di vista del profilo ematologico, possono essere

associate con demenza, AIDS e altre patologie croniche. Comune è la presenza di carenze marginali di cobalamina negli anziani (25%); in questi casi si osservano basse concentrazioni plasmatiche di cobalamina, aumentata concentrazione plasmatica di acido metil-malonico, spesso senza altre anomalie ematologiche (van Asselt, 1998). Altri gruppi a rischio nel caso di eccessive supplementazioni di folati sono i vegetariani o coloro che seguono diete macrobiotiche essendo questi regimi dietetici poveri di vitamina B₁₂ (SINU, 1996).

Bibliografia

- Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995;274:1049–1057.
- Bower C, Wald NJ. Review: Vitamin B12 deficiency and the fortification of food with folic acid. *Eu J Clin Nutr* 1995;49:787-793.
- Butterworth CE, Tamura T. Folic acid safety and toxicity: a brief review. *Am J Clin Nutr* 1989;50:353-358.
- Butterworth CE. Folate status, women's health, pregnancy outcome, and cancer. *J Am Coll Nutr* 1993;12:438-441.
- Campbell NRC. How safe are Folic Acid supplements? *Arch Intern Med* 1996;156:1638-1644.
- Chanarin I. *The megaloblastic anaemias*, 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1979.
- Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. *JAMA* 1995;274:1698–1702.
- Dickinson CJ. Does folic acid harm people with vitamin B12 deficiency? *Q J Med* 1995;88:357-364.
- Food and Agricultural Organisation (FAO), World Health Organisation (WHO). *Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B₁₂*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation.
- Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1988 (FAO Food and Nutrition Series, No. 23).
- Food and Drug Administration (FDA). *Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; Folic acid (Folacin)*. Federal Register, vol 61, no 44, March 1996, pp 8797- 8803.
- Food and Drug Administration (FDA). *Food labelling: health claims and label statements; folate and neural tube defects*. Federal Register, vol 58, no 197, October 1993, pp 53254-53270.
- Food and Nutrition Board. *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline*. Washington, DC: National Academy Press, 1998.
- Food and Nutrition Board. *Report of the Standing Committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes and its panel on folate and other B-vitamins and choline*. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
- French AE, Grant R, Weitzman S, Ray JG, Vermeulen MJ, Sung L, Greenberg M, Koren G. Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:288-294.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. Multivitamin use, folate and colorectal cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 1998;129:517–524.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Trichopoulos D, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:875-884.
- Gregory JF. Bioavailability of folate. *Eu J Clin Nutr* 1997;51:554–559.

- Kim YI, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Norton R, Arora S, Paiva L, Mason JB. Colonic mucosal concentrations of folate correlate well with blood measurements of folate in persons with colorectal polyps. *Am J Clin Nutr* 1998;68:866–872.
- Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993;86:703–708.
- Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency. II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34:99–107.
- Mason JB. Folate status: effect on carcinogenesis. In: Bailey LB (Ed.). *Folate in health and disease*. New York, NY: Marcel Dekker; 1995. p. 361–378.
- McPartlin J, Halligan A, Scott JM, Darling M, Weir DG. Accelerated folate breakdown in pregnancy. *The Lancet* 1993;341:148–149.
- Olivares M, Hertrampf E, Llaguno S, Stekel A. Nutritional intake of folic acid in breast-fed infants. *Bol Oficina Sanit Panam* 1989;106(3):185–192.
- Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentrations and risk of stroke in middle aged British men. *The Lancet* 1995;346:1395–1398.
- Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31–62.
- Salmenpera L, Perheentupa J, Siimes MA. Folate nutrition is optimal in exclusively breast-fed infants but inadequate in some of their mothers and formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986;5(2):283–289.
- Sauberlich H. Folate status in the US population groups. In: Bailey LB (Ed.). *Folate in health and disease*. New York, NY: Marcel Dekker; 1995. p. 171–194.
- European Commission. Scientific Committee on Food (SCF). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Folate*. - Health & Consumer Protection Directorate-General. Bruxelles, Belgium: SCF; 2000.
- Scott JM, Weir DG, Molloy A, McPartlin J, Daly L, Kirke P. The role of folate in the prevention of neural tube defects. *Proc Nutr Soc* 1994;53:631–636.
- Scott JM, Weir DG. Homocysteine and cardiovascular disease. *Q J Med* 1996;89:561–563.
- Selby JV, Friedman GD, Fireman BH. Screening prescription drugs for possible carcinogenicity: eleven to fifteen years of follow-up. *Cancer Res* 1989;49:5736–5747.
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693–2698.
- Smith AM, Picciano MF, Deering RH. Folate supplementation during lactation: maternal folate status, human milk folate content, and their relationship to infant folate status. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2(4):622–628.
- Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU). *Livelli di Assunzione Raccomandati di Energia e Nutrienti per la popolazione italiana – LARN*. Revisione 1996.
- Thompson JR, Fitz GP, Willoughby MLN, Armstrong BK. Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against leukaemia in childhood: a case control study. *The Lancet* 2001;358:1935–1940.
- Van Asselt DZ, De Groot LC, Van Staveren WA, Blom HJ, Wevers RA, Biemond I, Hoefnagels WH. Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 1998;68:328–334.

Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischaemic heart disease: results of a prospective study with implications on prevention. *Arch Intern Med* 1998;158:862–867.

White E, Shannon JS, Patterson RE. Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:769-774.

World Health Organisation (WHO), Food and Agriculture Organisation (FAO). Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition – Second Edition. Geneva: WHO; 2004.

Zimmerman MB, Shane B. Supplemental folic acid. *Am J Clin Nutr* 1993;58:127-128.

Strategie per aumentare l'apporto di folati nella dieta

I folati svolgono un ruolo centrale nella sintesi e nella metilazione dei nucleotidi e il loro ruolo nella sintesi e metabolismo delle proteine interagisce strettamente con quello della vitamina B₁₂. La combinazione di forte carenza di folati e di carenza di B₁₂ può portare all'insorgenza di anemia megaloblastica. Bassi apporti di folati sono anche associati con un più alto rischio di DTN e con un aumentato rischio di altri difetti congeniti, di malattie cardiovascolari, di tumori nell'adulto e con un deterioramento dei processi cognitivi.

Fattori di rischio per un adeguato apporto di folati sono: i bassi consumi di frutta, vegetali, legumi, cereali integrali; le alterazioni genetiche del metabolismo dei folati; i processi di malassorbimento e le infezioni da parassiti intestinali.

È evidente pertanto il ruolo cruciale rappresentato dal livello di assunzione di folati con la dieta e di conseguenza la necessità di mettere in atto interventi di salute pubblica consistenti essenzialmente in strategie mirate ad arricchire il contenuto in folati della dieta.

Tali strategie si possono così sinteticamente individuare :

- alimentazione arricchita in alimenti con elevato contenuto in folati;
- supplementazione, cioè assunzione di composti di sintesi, generalmente compresse di acido folico, in aggiunta ai folati naturali introdotti con la dieta;
- fortificazione, cioè aggiunta deliberata di acido folico nella formulazione e produzione di alimenti *ad hoc* individuati.

Queste strategie hanno l'obiettivo finale comune di migliorare la qualità della dieta, e quindi lo stato di nutrizione per i folati, ma sono diversificate per gli obiettivi specifici in relazione al gruppo di popolazione target e al marker nutrizionale considerato, oltre ovviamente che per l'approccio operativo.

Alimentazione con alimenti ricchi in folati

L'obiettivo di questo approccio è quello di riuscire a ricoprire (e superare) le raccomandazioni nutrizionali per i folati mediante il consumo di alimenti specifici, nel contesto di una dieta equilibrata. Le basi di questo approccio sono rappresentate dalla validità delle raccomandazioni e dalla disponibilità di dati completi e aggiornati sulla composizione degli alimenti e sul loro contenuto in folati.

Questi aspetti sono stati ampiamente trattati nei capitoli precedenti da cui emergono tutte le problematiche tuttora esistenti (evoluzione delle raccomandazioni in relazione alle nuove emergenti evidenze scientifiche, difficoltà metodologiche legate alla determinazione analitica e conseguente carenza di dati, biodisponibilità, dati sui consumi).

Lo strumento operativo di base deve essere rappresentato da adeguate linee guida istituzionali che traducano in termini di alimenti le raccomandazioni definite in termini di nutrienti e che diano consigli pratici di intervento non solo per il mantenimento della salute ma anche per la protezione dall'insorgere di patologie da carenza.

Le Linee guida per una sana alimentazione italiana elaborate dall'INRAN e dal MIPAF (1), rappresentano uno strumento utile in quanto riportano indicazioni per la popolazione in generale sui vantaggi di un incremento nell'apporto di folati e inoltre indicazioni specifiche per le diverse situazioni fisiologiche.

Accanto alla necessità di un attuale (e poi continuo aggiornamento) e di una capillare diffusione delle Linee guida sono indispensabili specifiche campagne, interventi e strumenti nell'ambito di programmi designati *ad hoc* per gruppi target di popolazione.

Un libretto particolarmente interessante per aumentare l'apporto di folati nella dieta è quello elaborato nell'ambito del progetto UE del V Programma quadro *Folate from food to functionality and optimal health* che contiene una serie di indicazioni pratiche per arricchire la dieta in folati.

Tale libretto, che è stato diffuso tra i partecipanti ad un trial specifico, potrebbe avere una sua utilizzazione e diffusione molto più vasta in interventi mirati all'aumento dell'apporto in folati nella dieta abituale.(2).

L'obiettivo di un più alto apporto di folati con gli alimenti può essere perseguito oltre che attraverso interventi specifici mirati ad una più alta assunzione di folati anche attraverso tutte le campagne mirate ad un più alto consumo di frutta e verdure perché, come già detto, molti tipi di frutta, verdure, ortaggi sono una buona fonte di folati.

Tali campagne richiedono molto impegno ed hanno tempi di ricaduta molto lunghi e incerti; basti pensare alla campagna condotta in USA *5 a day* per stimolare il consumo di 5 porzioni al giorno di frutta e verdure che, nonostante tutte le energie profuse, non ha dato finora i risultati attesi.

Supplementazione

Consiste nell'incremento dell'introito di folati mediante l'assunzione di acido folico di sintesi (o altri composti, generalmente sotto forma di compresse) in aggiunta alla dieta abituale.

È prevista per gruppi target di popolazione, per periodi definiti, a livelli diversi secondo il problema specifico (gravidanza, allattamento, prevenzione di situazioni patologiche), situazione tutte in cui un'alimentazione anche naturalmente arricchita non consente sempre di raggiungere con sicurezza i livelli di raccomandazione.

Un esempio classico di supplementazione con acido folico è quello previsto per la prevenzione dei DTN, ampiamente illustrata in questo volume. Questo approccio è stato alla base di campagne condotte in numerosi paesi come USA, Canada, Puerto Rico, Uk, Olanda negli ultimi dieci anni.

Purtroppo tali raccomandazioni spesso supportate da campagne di diffusione anche istituzionali hanno avuto ovunque una adesione molto bassa (Butriss J, 2004) (3).

La supplementazione è l'approccio generalmente adottato in tutti i trial in cui si vuole valutare l'efficacia del trattamento con acido folico in relazione a patologie specifiche, sia operando su gruppi di popolazione (come quelli "storici" che hanno dimostrato l'efficacia della riduzione dei DTN in Cina) che su campioni *ad hoc* individuati. Molti di tali studi sono stati già precedentemente citati.

La maggioranza delle evidenze scientifiche oggi disponibili sull'efficacia dell'acido folico (e dei relativi livelli di intervento) deriva da tali sperimentazioni che sono alla base anche delle attuali raccomandazioni.

Di particolare interesse sono i trial di supplementazione in cui i livelli di supplementazione con acido folico vengono confrontati con pari apporto di folati provenienti da alimenti e da cui emerge la superiorità dei folati derivanti da una ottimizzazione della dieta, oltre che come efficacia specifica come miglioramento più globale dello stato di nutrizione.

Fortificazione

La fortificazione è il processo di aumentare deliberatamente il contenuto di un micronutriente essenziale, nel caso specifico l'acido folico, in un alimento per migliorarne la qualità nutrizionale e fornire un beneficio di salute pubblica con minimo rischio per la salute.

La fortificazione può essere volontaria, cioè se praticata dalla singola industria alimentare che prende l'iniziativa di aggiungere il nutriente nel rispetto della legislazione del Paese, o obbligatoria quando è imposta senza possibilità di deroga da una norma legislativa formulata *ad hoc*.

Il processo di fortificazione degli alimenti con acido folico è stato preso in considerazione e messo in pratica essenzialmente in relazione al problema dei DTN e all'opportunità di tale intervento per raggiungere una loro riduzione, considerando la popolazione generale.

La fortificazione obbligatoria è oggi in atto in USA, Canada e Cile; ed risultati ottenuti sono stati valutati in diverse rassegne (Butriss J, 2004 (3); Eichholzer M. *et al.* 2006(4)).

Può essere interessante esaminare più in dettaglio la situazione USA sia per quanto riguarda la sua attuazione che la valutazione ad oggi degli effetti.

Nel 1992 il Public Health Service USA, per ridurre i casi di spina bifida e altri difetti del tubo neurale, formula una raccomandazione per l'assunzione di 400 mcg/die di acido folico da parte di tutte le donne in età fertile proponendo approcci diversi per la sua attuazione (miglioramento delle abitudini alimentari, fortificazione, uso di supplementi) e organizzando campagne di educazione alimentare. Preso atto dello scarso consenso ottenuto dalla raccomandazione, nel 1996 la FDA decide la fortificazione obbligatoria con 140mg di acido folico/100g di prodotto a base di cereali (farina, riso, pane, prodotti da forno, mais ecc) già arricchiti con vit. B₁, B₂, ferro. La previsione è quella di aumentare di circa 100mcg/die l'apporto in folati.

Dal 1/1/1998 la fortificazione obbligatoria diventa operativa.

Numerosissimi studi sono stati condotti (e altri sono tuttora in corso) per verificare gli effetti della fortificazione. Tali effetti si possono valutare prendendo in esame il contenuto in folati degli alimenti dopo la fortificazione, i livelli di assunzione, l'incidenza dei DTN e lo stato di nutrizione per i folati.

Rader *et al.* (2000)(6) analizzando con metodo microbiologico e digestione trienzimatica oltre 160 alimenti e ingredienti fortificati hanno trovato un contenuto in folati significativamente superiore (spesso il doppio) rispetto sia al valore prescritto dalla fortificazione che a quello riportato in etichetta. Cho *et al.* (7) hanno trovato un contenuto in folati raddoppiato o triplicato come conseguenza della fortificazione. Quinlivan & Gregory (8) dall'analisi di regressione lineare di dati di folati plasmatici di studi pubblicati hanno calcolato un intake in acido folico più che doppio rispetto alle previsioni.

Choumenkovitch *et al.* (9) su 1480 soggetti della 5 e 6 fase del Framingham Offspring Cohort Study (rappresentativi rispettivamente delle fasi pre- e post-fortificazione) hanno trovato un incremento tra pre- e post-fortificazione doppio rispetto alle previsioni, mentre l'apporto di

folati naturali rimaneva invariato. Inoltre nella fascia di consumatori di supplementazioni multivitaminiche sono stati riscontrati valori di apporto di acido folico superiore ai 1000 mcg considerato come *upper tolerable limit*.

Per quanto riguarda lo stato di nutrizione per i folati tutte le indagini condotte al riguardo hanno rilevato un incremento significativo dei folati plasmatici ed eritrocitari e una riduzione dell'omocisteina (5, 10).

Per quanto riguarda l'incidenza dei DTN, la cui riduzione era l'obiettivo primario, il CDC (11) ha riscontrato una riduzione del 26% dei casi di spina bifida e anencefalia tra periodo prefortificazione (1995-1996) e postfortificazione (1999-2000)

Accanto ai risultati positivi riscontrati molte perplessità sono sorte rispetto al mascheramento della diagnosi di carenza di vitamina B₁₂ negli anziani, interazioni con farmaci antiepilettici e antifolati, possibilità di induzione di alcuni tipi di tumore.

In conclusione si può dire che l'incremento nell'apporto di folati sotto forma di alimenti è quello ottimale perché associato ad un miglioramento più globale della dieta e di conseguenza dello stato di nutrizione, tuttavia non permette di soddisfare la raccomandazione per situazioni particolari come la prevenzione dei DTN o situazioni patologiche di notevole gravità.

La supplementazione è altamente efficiente nell'ottimizzare lo stato di salute per i folati ma non è attualmente una efficace strategia nella prevenzione primaria a causa della bassa compliance.

La fortificazione obbligatoria sembra positiva per la sua praticità e certezza di intervento in quanto non richiede nessuna campagna di informazione ed educazione alimentare, non richiede cambiamenti nelle abitudini alimentari, né attivazione di nuovi canali di distribuzione e raggiunge tutta la popolazione durante tutto il corso dell'anno. Tuttavia presenta diversi aspetti problematici: raggiunge indiscriminatamente per tutto l'arco della vita tutte le fasce di popolazione, anche quelle per cui un aumentato apporto può essere controindicato, può esporre alcuni gruppi al rischio di un apporto eccessivo le cui conseguenze richiedono attenta valutazione, ed elimina completamente la consapevolezza dell'individuo nella gestione della propria dieta. Altra considerazione, che esula dagli aspetti strettamente nutrizionali ma che richiede attenta valutazione in Italia è l'impatto del processo di fortificazione sulla produzione della ricchissima gamma di alimenti tradizionali, spesso di nicchia.

Pertanto addizionali approcci creativi di salute pubblica dovrebbero essere sviluppati per la prevenzione dei DTN e per migliorare lo stato di nutrizione per i folati. La fortificazione volontaria potrebbe essere uno di questi.

Bibliografia

1. MIPAF-INRAN Linee guida per una sana alimentazione italiana. 2003
2. Ruggeri S, Camilli E, Carnovale E. I folati: dagli alimenti al miglioramento della salute. 2002 INRAN
3. Buttriss J. Strategies designed to increase awareness about folate and health, and to increase folate intake: a review. *Trends in food Sci and Technol* 2004;16 (6-7):246-252.
4. Eichholzer M, Tonz O, Zimmermann R. Folic acid : a public health challenge. *The Lancet* 2006; 367: 1352:61 .
5. Yetley E.A. and Rader J.I. Modeling the level of fortification and post-fortification assessment; U.S. Experience. *Nutr. Reviews* 2004, 62 (N.6):S50-S59.
6. Rader J.I, Weaver C.M, Angyal G. Total folate in enriched cereal grain products in the United states following fortification. *Food Chemistry* 2000, 70:275-289.

7. Cho S, Johnson G, Song W.O. Folate content of foods: comparison between databases compiled before and after new FDA fortification Requirement. *J. Food Comp. Anal* 2002,15:293-307.
8. Quinlivan E.P. and Gregory J.F.III. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003, 77(N°1) :221-225.
9. Choumenkovitch S. F, Selhub j, Wilson P.W.F, Rader J.I, Rosenberg I.H. and Jacques P.F. *J. Nutr* 2002,132:2792-2798.
10. Bailey L.B, Rampersaud G.C. and Kauwell G.P.A.. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer :evolving evidence. *J Nutr* 2003,133.1961S-1968S.
11. Center for Diseases Control and Prevention (CDC) Spina bifida and anencephaly before and after folic acid mandate-United States,1995-1996 and 1999-2000. *MMWR* 2004;53:362-5.

ACIDO FOLICO: NUOVI ASPETTI NELLA VALUTAZIONE RISCHIO- BENEFICIO

Alberto Mantovani, Francesca Baldi
Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità

Prevenzione dei difetti congeniti mediante acido folico e analisi del rischio in sicurezza alimentare

Un gruppo di lavoro organizzato nel novembre 2002 dalla *World Health Organization* e dell'ISS (1) ha sottolineato che vi è un'evidenza consolidata circa il ruolo di un adeguato apporto di acido folico (anche vitamina B9, la forma stabile dei folati) per la riduzione del rischio di difetti del tubo neurale ed anche di altri difetti congeniti. Per aumentare l'assunzione di acido folico a partire dalla fase periconcezionale e durante l'organogenesi, è importante sia promuovere, come obiettivo a lungo termine, un'alimentazione ricca ed equilibrata con un elevato contenuto di vegetali freschi, sia assicurare la supplementazione con acido folico alle donne che programmano una gravidanza. Tuttavia, il documento sottolinea l'importanza della *fortificazione* di componenti di base dell'alimentazione, in particolar modo della farina di frumento, quale strumento di intervento prioritario rispetto alla supplementazione (che coprirebbe in maniera adeguata solo una fascia di donne informate e sensibilizzate) ed all'adozione generalizzata di un'alimentazione sana ed equilibrata (che rappresenterebbe un obiettivo prioritario ma realisticamente raggiungibile solo a lungo termine).

Nell'ambito della fortificazione si possono distinguere due livelli di intervento: la promozione della disponibilità di alimenti fortificati e le prassi di fortificazione generalizzata e obbligatoria di taluni alimenti di base adottata da alcuni Paesi (Irlanda, Israele, Canada, USA, Cile) (1). Tuttavia nel considerare la fortificazione con acido folico, come per ogni altro intervento di prevenzione attraverso l'alimentazione, occorre affrontare e valutare alcuni problemi che vanno oltre la base di evidenze scientifiche, indubbiamente solida, che ne giustifica l'adozione. Occorre, infatti, approntare strumenti per monitorare l'efficacia dell'intervento; inoltre, va considerata attentamente l'accettabilità nel contesto Europeo di un'azione, come la fortificazione obbligatoria, che potrebbe essere interpretata come un intervento atto a ridurre la capacità di scelta informata del cittadino. Soprattutto, non può venire trascurata la *valutazione della sicurezza* di un intervento che coinvolgerebbe l'intera popolazione, compresi soggetti particolarmente "esposti" (cioè con una forte assunzione alimentare di folati) o vulnerabili ad eventuali effetti indesiderati.

La *European Food Safety Authority* (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/>), responsabile della valutazione del rischio in sicurezza alimentare a livello europeo, dà attenzione ai possibili rischi per la salute associati all'apporto non solo carente, ma anche squilibrato od eccessivo, di componenti normali della dieta; tali problemi vengono affrontati direttamente dal Gruppo di esperti scientifici sui prodotti dietetici, l'alimentazione e le allergie (NDA, *Panel on dietetic products, nutrition and allergies*) (2). Inoltre, valutazioni relative al potenziale rischio di assunzione di nutrienti possono venire affrontate, caso per caso, anche da altri Gruppi di esperti dell'EFSA: il Gruppo sugli additivi alimentari, gli aromatizzanti, i coadiuvanti tecnologici e i materiali a contatto con gli alimenti (AFC, *Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food*) (3) affronta problemi riguardanti la sicurezza di sostanze

deliberatamente aggiunte ai prodotti alimentari, quindi anche di supplementi come ad esempio, il calcio-l-metilfolato (4). Anche il Gruppo sugli additivi, prodotti o sostanze usati nei mangimi (FEEDAP, *Panel on additives and products or substances used in animal feed*) (5) nel caso degli additivi nutrizionali negli animali da reddito considera i potenziali rischi per i consumatori derivanti da un'assunzione eccessiva attraverso gli alimenti di origine animale di determinati nutrienti, come ad esempio il selenio (6).

E' evidente, infine, che gli aspetti generali di valutazione del rischio affrontati dall'EFSA non possono tradursi sempre meccanicamente in strategie per la prevenzione di determinate patologie e per la gestione dei rischi associati all'alimentazione a livello di Paesi membri dell'Unione Europea, che richiedono invece un'attenta valutazione delle specifiche caratteristiche della situazione nazionale.

Recenti acquisizioni scientifiche di potenziale interesse per la valutazione rischio-beneficio dell'acido folico

Il gruppo di lavoro organizzato dalla *World Health Organization* e dall'ISS nel 2002 ha considerato che non vi sono motivi validi per ritardare la promozione della disponibilità di alimenti fortificati con acido folico, per quanto ulteriori ricerche siano auspicabili per una più accurata valutazione rischio-beneficio (1).

In effetti, la necessità di un incremento delle conoscenze per un'adeguata caratterizzazione dei rischi e dei benefici delle strategie per incrementare l'assunzione di acido folico riceve ulteriore sostegno da alcuni dati scientifici recenti:

In primo luogo, le strategie di fortificazione si sono finora sempre focalizzate su alimenti di base di origine vegetale, come le farine di cereali più diffuse. Tuttavia, non può essere escluso un ruolo accresciuto per i prossimi anni degli *alimenti di origine animale*. Studi sull'arricchimento del contenuto di folati di prodotti come carne e uova mediante la fortificazione dei mangimi potrebbero condurre a cambiamenti significativi dell'attuale scenario di esposizione ai folati attraverso la dieta, ovviamente qualora tale fortificazione passasse il vaglio delle autorità preposte alla regolamentazione e venisse applicata su larga scala alle principali produzioni animali (7, 8).

In secondo luogo, è noto come alcuni *fattori non associati a polimorfismi genetici*, quali farmaci (ad esempio, taluni antiepilettici, antitumorali ed antibatterici) e stili di vita ed alimentari (fumo di sigaretta, elevato consumo di alcolici) possano interferire con l'assorbimento, il metabolismo e/o il fabbisogno di acido folico: devono, tuttavia, ancora essere adeguatamente valutate le possibili ricadute dell'esposizione a tali fattori, singoli o in combinazione, nei confronti dell'efficacia delle strategie per incrementare l'assunzione di acido folico (9, 10). Ancora meno noto è il problema delle interazioni fra folati e contaminanti ambientali, in particolare con l'arsenico, un metallo pesante diffuso negli alimenti e nell'ambiente che induce stress ossidativo nell'essere umano (11) nonché difetti del tubo neurale in ceppi di roditori da laboratorio con difetti nel metabolismo dei folati (12). Gli studi disponibili indicano un potenziale ruolo protettivo dei folati nei confronti degli effetti dell'arsenico (11, 12); nel contempo, le evidenze potrebbero suggerire che livelli elevati esposizione all'arsenico, ed eventualmente altri contaminanti ambientali, aumentano il fabbisogno di folati, rendendo così i soggetti esposti più vulnerabili ad effetti avversi sulla salute associati ad un apporto insufficiente.

Infine, alcuni recenti studi epidemiologici sembrerebbero suggerire alcuni dubbi sulla sicurezza di un incremento dell'assunzione di folati nella popolazione generale, in relazione al

rischio per il cancro alla prostata, una delle principali patologie oncologiche nei Paesi industrializzati. Uno studio prospettico svedese ha evidenziato una correlazione positiva fra il rischio ed i livelli plasmatici di vitamina B12 e, in minor misura, di folati (13); il ruolo di polimorfismi della metilentetraidrofolatoreduttasi (enzima chiave per il ruolo dei folati nel metabolismo degli aminoacidi solforati) sembra tutt'al più modesto (14). Per contro, uno studio di coorte effettuato negli USA ha osservato un modesto effetto protettivo di elevati livelli di folati nella dieta (15). Gli studi del gruppo svedese sono in contrasto con svariati studi, anche recenti, che mostrano un possibile effetto protettivo dell'assunzione di folati attraverso nei confronti di altri tipi di tumori, ad esempio il tumore pancreatico (16); tuttavia, altri studi sul tumore mammario non escludono un possibile aumento di rischio associato ad elevati livelli di assunzione di supplementi (17). Pertanto i dati sul rischio cancerogeno associato all'assunzione di folati meritano considerazione come stimolo per l'approfondimento della valutazione di sicurezza della fortificazione con acido folico per la popolazione generale, la quale comprende quindi una varietà considerevole di situazione dal punto di vista della costituzione genetica, predisposizioni patologiche, stato di salute, stili di vita, esposizioni ambientali, ecc.

Pertanto, accanto all'incremento delle conoscenze, la valutazione rischio-beneficio delle strategie per aumentare l'apporto di acido folico a livello nazionale dovrebbe idealmente considerare elementi quali la incidenza dei difetti congeniti prevenibili, la frequenza di altri fattori di rischio quali determinati polimorfismi genetici, e soprattutto le abitudini alimentari della popolazione (9, 10).

I paragrafi successivi intendono fornire solo uno spunto di discussione in tal senso, utilizzando gli strumenti offerti dall'analisi del rischio in sicurezza alimentare per valutare lo scenario di una possibile prassi di fortificazione generalizzata della farina di frumento in una popolazione forte consumatrice degli alimenti a base di questo cereale, quale quella italiana.

Fortificazione della farina di frumento con acido folico

Valutazione dell'esposizione

Sulla base di dati forniti dal sito internet della Confesercenti il consumo pro capite di frumento in Italia nel 2004 è stato stimato a 151 kg/pro capite/anno, corrispondenti a 0,414 kg/die (18).

Considerando il livello raccomandato di fortificazione nel Regno Unito ed in Ucraina (240 µg/100 g farina) (1) ed assumendo una fortificazione generalizzata della farina di frumento questo porterebbe ad un'assunzione giornaliera di 994 µg/die.

Per la prevenzione dei difetti del tubo neurale un livello di fortificazione maggiore (500 µg/100 g farina) è considerato ottimale da alcuni esperti (1): questo porterebbe ad un'assunzione giornaliera di 2.070 µg/die.

Per contro il livello di fortificazione obbligatoria negli USA (140 µg/100 g farina) (1) porterebbe ad un'assunzione giornaliera di 579 µg/die.

Naturalmente si tratta di calcoli molto grossolani, che non tengono conto di fattori quali la presenza di fasce di forti consumatori di prodotti a base di grano (pane, pasta, grissini...), presenti in particolare in talune Regioni italiane e/o fasce di età) nonché delle variazioni di concentrazione durante la manifattura degli alimenti. Pertanto queste stime vanno considerate meramente indicative dell'ordine di grandezza dell'assunzione di acido folico mediante differenti livelli di fortificazione.

La stima dell'assunzione basale di folati in Italia, Paese in cui non vi è un consumo diffuso di alimenti fortificati, varia con le aree regionali, gli stili alimentari e le fasce di età considerate;

secondo i dati dell'Istituto Nazionale di Ricerca sugli Alimenti e la Nutrizione l'assunzione basale può stimarsi in un intervallo di 200-350 µg/die (10).

Il documento sui folati prodotto nel 2000 dallo Scientific Committee on Food (SCF) della Commissione Europea (cioè l'organo per la valutazione del rischio nel campo della sicurezza alimentare prima della costituzione dell'EFSA nel 2002) ha riportato diversi dati di assunzione basale attraverso la dieta in diversi Paesi europei; in Italia il 97,5-percentile di assunzione è intorno ai 550 µg/die (19).

Nell'analisi del rischio occorre porsi nella situazione del caso "ragionevolmente peggiore"; nel caso di nutrienti, si può considerare l'assunzione abituale di alimenti "speciali" o integratori ad elevata concentrazione della sostanza in esame. Secondo la base di dati nazionale sui nutrienti dello *US Department of Agriculture* (USDA) (20), si può considerare il consumo abituale di un cucchiaino di lievito di birra con un contenuto di folati dai 90 ai 160 µg.

Valutazione del rischio

Nel 2000 lo SCF ha valutato il livello massimo tollerabile di assunzione di folati (19). In mancanza a tutt'oggi (settembre 2006) di una valutazione da parte della EFSA, il documento del SCF rappresenta la valutazione più aggiornata in ambito europeo.

Pur tenendo conto di altri effetti (ipersensibilità, interazioni con farmaci ecc.), il livello massimo tollerabile è definito sulla base della relazione dose-risposta per il mascheramento, dell'insorgenza dei sintomi neurologici associati all'anemia perniciosa causata da carenza di vitamina B₁₂; l'effetto avverso principale dei folati, sostanze considerate pressoché prive di tossicità intrinseca, è quindi rappresentato dal contrastare le manifestazioni strettamente ematologiche nascondendo l'insorgenza più lenta di gravi alterazioni nervose sino alla loro piena manifestazione clinica.

Su questa base il livello massimo tollerabile è di 1000 µg/die per l'adulto. I livelli massimi tollerabili per i bambini e adolescenti (aggiustati sulla base del peso corporeo) sono di 200 (età 1-3 anni), 300 (4-6 anni), 400 (7-10 anni), 600 (11-14 anni) e 800 (15-17 anni) µg/die.

La valutazione dello SCF riconosce che il livello massimo tollerabile è definito su base cautelativa per un effetto avverso su un *gruppo di soggetti particolarmente vulnerabili*, cioè la ristretta frazione di popolazione con carenza di vitamina B₁₂. Lo SCF nota, tuttavia, come anche l'alimentazione vegana o macrobiotica (attualmente in crescita anche in Italia) possa essere maggiormente a rischio di carenza di vitamina B₁₂ (19).

Utilizzando il livello massimo tollerabile definito dallo SCF per le diverse fasce di età e i semplici, meramente indicativi, scenari di assunzione delineati nel paragrafo precedente, si possono effettuare le seguenti stime:

con il livello di fortificazione *adottato negli USA*, l'assunzione massima tollerabile di 1000 µg definita dallo SCF per la popolazione generale adulta *non viene superato* anche con una fortificazione generalizzata della farina di frumento:

$$\begin{aligned} & 579 \mu\text{g da consumo medio di alimenti fortificati} + \\ & 350 \mu\text{g come intervallo superiore del consumo basale medio di folati} = \\ & 929 \mu\text{g.} \end{aligned}$$

Un superamento marginale potrebbe avvenire ad elevati livelli di consumo di uno od ambedue le componenti (es. il 97,5° percentile del consumo basale di folati, 550 µg /die) e/o con l'assunzione abituale di lievito di birra.

Livelli medi di assunzione di alimenti fortificati potrebbero tuttavia portare ad un *superamento per gli adolescenti*: in questa fascia di popolazione si può avere un forte consumo di farinacei (paragonabile o persino maggiore rispetto agli adulti), ma l'assunzione massima tollerabile è

minore rispetto agli adulti sulla base del peso corporeo (600 e 800 µg /die per la fasce di età 11-14 e 15-17 anni).

Un superamento significativo dei 1000 µg indicati dallo SCF diventa sicuramente più probabile con livelli maggiori di fortificazione. Ad esempio, nella situazione italiana il consumo di alimenti a base di farina di grano con un livello di fortificazione pari a 240 µg /100 g potrebbe *di per sé* portare al raggiungimento del livello massimo tollerabile definito dallo SCF.

Considerazioni conclusive

Le considerazioni effettuate nei paragrafi precedenti intendono puramente stimolare ulteriori ricerche sulla valutazione rischio-beneficio dell'acido folico: appare tuttavia opportuno indicare alcuni punti.

Per la prevenzione dei difetti congeniti, in particolare dei difetti del tubo neurale, non vi sono dubbi sull'efficacia generale, ancorché probabilmente limitata almeno nel breve-medio termine, di interventi quali la diffusione della supplementazione periconcezionale fra le donne in età fertile e, soprattutto, la promozione di un'alimentazione varia ed equilibrata (1, 9, 10).

La valutazione dell'efficacia nelle specifiche situazioni deve tuttavia tenere di elementi chiave per l'analisi del rischio in campo alimentare, quali:

eventuali cambiamenti sia nei consumi alimentari (es. la diffusione del vegetarianismo) sia nella disponibilità di alimenti, anche di origine animale (7, 8), prodotti e messi sul mercato con l'obiettivo di richiamare il consumatore mediante un maggiore contenuto di folati e/o di altri nutrienti

la esposizione delle donne in età fertile a fattori (alimentari, ambientali, farmacologici) che possono aumentare, attraverso svariati meccanismi, il fabbisogno di acido folico (9-12) identificando in tal modo particolari sottogruppi potenzialmente a maggiore rischio nell'ambito della popolazione generale. Indicazioni in tal senso vengono dallo studio di una popolazione in Bangladesh esposti ad alti livelli ambientali di arsenico (21).

Per quanto riguarda la prassi di fortificazione è indispensabile una valutazione bilanciata che identifichi e quantifichi i possibili rischi per la salute, in modo da tarare l'intervento escludendo la presenza di rischi evidenziabili sulla base delle attuali conoscenze.

Sulla base dei dati disponibili, appare prematuro trarre conclusioni definitive sulla sicurezza della fortificazione generalizzata della farina di frumento in una popolazione, quale quella italiana, con forte consumo di farinacei. Occorre ricordare che l'adozione di questa prassi porterebbe al consumo di alimenti fortificati da parte di tutte le componenti della popolazione, cioè non solo delle donne in età fertile ma anche in adolescenti, anziani, etc.

Anche alla luce di recenti studi appare infine, necessario disporre di dati scientifici che consentano una più accurata valutazione rischio-beneficio della fortificazione con acido folico anche in accordo con quanto raccomandato da altri documenti sull'argomento prodotti dall'ISS (1, 10). I dati critici sono:

- la reale assunzione di folati attraverso la dieta,
- i possibili effetti avversi dei folati, con particolare riguardo al chiarimento delle interazioni fra livelli di assunzione e rischio cancerogeno (14-17),
- infine, la possibile presenza di sottogruppi di popolazione potenzialmente più vulnerabili a tali effetti.

Sulla base di un approccio cautelativo e dei parametri definiti dalla Commissione Europea (19), non sembra raccomandabile l'adozione di una prassi di fortificazione generalizzata di alimenti base quali la farina di grano. Un'opzione preferibile, da affiancare alla

supplementazione ed all'educazione alimentare, sembra quella di promuovere la disponibilità e l'accesso da parte della popolazione generale a vari alimenti fortificati con acido folico.

Bibliografia

1. Taruscio D. *Folic acid: from research to public health practice*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2004. (Rapporti ISTISAN 04/26).
2. European Food Safety Authority (EFSA). *Panel on dietetic products, nutrition and allergies (NDA)*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/nda.html>; ultima consultazione 14/11/2006.
3. European Food Safety Authority (EFSA). *Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC)*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/afc.html>; ultima consultazione 14/11/2006.
4. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the AFC Panel related to Calcium L-Methylfolate *EFSA J*. 2004; 135:1-20.
5. European Food Safety Authority (EFSA). *Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP)*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap.html>; ultima consultazione 14/11/2006.
6. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel FEEDAP on the safety and efficacy of the product Sel-Plex 2000 as a feed additive according to Regulation (EC) No 1831/2003. *EFSA J*. 2006;348:1-40.
7. Hebert K, House JD, Guenter W. Effect of dietary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens. *Poult Sci*. 2005; 84:1533-8.
8. McCann ME, McCracken KJ, Hoey L, Pentieva K, McNulty H, Scott J. Effect of dietary folic acid supplementation on the folate content of broiler chicken meat. *Br Poult Sci*. 2004;45,Suppl.1:S65-6.
9. Taruscio D, Mantovani A, Stazi AV. Birth defects and folates: summary of the Italian workshop (December, 2001). *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003;67:457-9.
10. Mantovani A, Stazi AV, Taruscio D. *Interazioni geni e ambiente: folati e malformazioni congenite*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2002. (Rapporti ISTISAN 02/26).
11. Gamble MV, Liu X, Ahsan H, Pilsner R, Ilievski V, Slavkovich V, Parvez F, Levy D, Factor-Litvak P, Graziano J.H. Folate, homocysteine, and arsenic metabolism in arsenic-exposed individuals in Bangladesh. *Environ Health Perspect*. 2005;113:1683-8.
12. Spiegelstein O, Gould A, Wlodarczyk B, Tsie M, Lu X, Le C, Troen A, Selhub J, Piedrahita J.A, Salbaum JM, Kappen C, Melnyk S, James J, Finnell R.H. Developmental consequences of in utero sodium arsenate exposure in mice with folate transport deficiencies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;203:18-26.
13. Hultdin J, Van Guelpen B, Bergh A, Hallmans G, Stattin P. Plasma folate, vitamin B12, and homocysteine and prostate cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer*. 2005; 113: 819-24.
14. Van Guelpen BR, Wiren SM, Bergh AR, Hallmans G, Stattin PE, Hultdin J. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and the risk of prostate cancer: a nested case-control study. *Eur J Cancer Prev*. 2006;15:46-50.
15. Stevens VL, Rodriguez C, Pavluck AL, McCullough ML, Thun MJ, Calle EE. Folate nutrition and prostate cancer incidence in a large cohort of US men. *Am J Epidemiol*. 2006;163:989-96.
16. Larsson SC, Hakansson N, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake and pancreatic cancer incidence: a prospective study of Swedish women and men. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98: 407-13.
17. Kim YI. Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? *Nutr Rev*. 2006;64:468-75.

18. Ufficio Economico Confesercenti. *Come sono mutati i consumi e le abitudini alimentari dagli anni '70 ad oggi*. Lerici, 17 ottobre 2002. Disponibile all'indirizzo: http://www.confesercenti.it/documenti/doc_uffici/fiesa_trentennale.pdf; ultima consultazione 14/11/2006.
19. European Commission. Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Folate. 2000. SCF/CS/NUT/UPPLEV/18.
20. US Department of Agriculture (USDA). *National Nutrient Database for Standard Reference*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR18/nutrlist/sr18a435.pdf>; ultima consultazione_14/11/2006.
21. Gamble MV, Liu X, Ahsan H, Pilsner JR, Ilievski V, Slavkovich V, Parvez F, Chen Y, Levy D, Factor-Litvak P, Graziano JH. Folate and arsenic metabolism: a double-blind, placebo-controlled folic acid-supplementation trial in Bangladesh. *Am J Clin Nutr*. 2006;84:1093-101.

MALFORMAZIONI CONGENITE SENSIBILI ALL'AZIONE DELL'ACIDO FOLICO: L'ANDAMENTO DEL FENOMENO IN ITALIA

Anna Pierini (a), Fabrizio Bianchi (a), Fabrizio Minichilli (a), Sebastiano Bianca (b), Elisa Calzolari (c), Gioacchino Scarano (d), Romano Tenconi (e), Elvira Agazio (f), Paolo Salerno (f), Domenica Taruscio (f)

(a) *Istituto di Fisiologia Clinica, Sezione di Epidemiologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pisa*

(b) *Servizio di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera "G. Garibaldi", Catania*

(c) *Servizio di Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara*

(d) *Unità Operativa Complessa di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera "G. Rummo", Benevento*

(e) *Servizio di Genetica Clinica ed Epidemiologica, Università e Azienda Ospedaliera di Padova*

(f) *Dipartimento Biologia Cellulare e Neuroscienze, Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Introduzione

L'acido folico è una vitamina idrosolubile del gruppo B che assume funzione coenzimatica nella sintesi degli acidi nucleici, nel metabolismo degli aminoacidi, e nella formazione delle cellule del sangue e di alcuni costituenti del tessuto nervoso, dopo essere stato ridotto ad acido tetraidrofolico, forma attiva di folato nell'organismo.

La carenza di folati è uno dei deficit vitaminici più comuni e può essere conseguente a inadeguata introduzione, aumentato fabbisogno, alterato assorbimento e metabolismo o assunzione di farmaci antagonisti.

Nel ciclo metabolico complesso dei folati, la mancanza, diretta o indiretta, di metiltetraidrofolato (MTHFR) dovuta a carenza di folati, può determinare un accumulo di omocisteina, a cui viene attribuito un ruolo importante nell'insorgenza di eventi avversi della gravidanza quali l'abortività spontanea ricorrente, il ritardo di crescita intrauterino, la pre-eclampsia e il distacco placentare. Risulta quindi fondamentale definire il ruolo dell'omocisteina in gravidanza, così come il potenziale effetto dell'acido folico nel ridurre le complicazioni ostetriche.

A partire dagli anni '80 numerosi studi hanno dimostrato l'associazione tra assunzione di acido folico in periodo periconcezionale e riduzione della prevalenza di difetti del tubo neurale (DTN).

I DTN comprendono anencefalia, iniencefalia, craniorachischisi, spina bifida ed encefalocele (1). La pubblicazione dei risultati del *Medical Research Council Vitamin Study* (2) nel 1991 costituisce la prima prova documentata relativa all'efficacia dell'assunzione periconcezionale di acido folico, da solo o con un prodotto multivitaminico, nella prevenzione dei DTN.

Le prime evidenze relative alla possibilità di prevenire altre malformazioni sono state riportate negli anni '90 (3). Le malformazioni la cui frequenza potrebbe essere ridotta in seguito alla supplementazione con acido folico sono alcune cardiopatie (difetti del setto interventricolare, tetralogia di Fallot, trasposizione completa dei grossi vasi), labio e/o palatoschisi, difetti del tratto urinario, ipo-agenesie degli arti, onfalocele e atresia anale (4-6).

Sulla base di prove di efficacia ottenute in Paesi diversi dall'Italia (7-12) si può affermare che la regolare supplementazione di acido folico iniziata prima del concepimento riduce il

rischio di DTN del 50-70%. Tale supplementazione potrebbe anche ridurre il rischio di altri difetti congeniti nel loro insieme (riduzione stimabile intorno al 10-20%) tra cui alcuni relativamente comuni come le cardiopatie congenite e le labio-palatoschisi.

Oltre ai provati effetti protettivi nei confronti dei DTN, sono stati descritti ulteriori benefici della fortificazione anche per altre condizioni malformative e per altre malattie.

Numerosi studi epidemiologici sono stati condotti con l'obiettivo di indagare gli effetti a lungo termine della fortificazione con acido folico su eventi quali anemia, malattie cardiovascolari, ipertensione, altri difetti congeniti, disturbi neuropsichiatrici e tumori (13-15).

Una rassegna effettuata su alcuni studi osservazionali ha evidenziato inoltre un'associazione inversa tra assunzione di folati e frequenza di carcinomi coloretali, e, meno chiaramente, di adenomi; l'associazione dello stesso tipo osservata anche per il tumore alla mammella risulterebbe modulata dal consumo di alcool da parte della donna (16).

Le politiche di sanità pubblica che sono state adottate nei vari paesi variano dalla supplementazione con acido folico, accompagnata ad una dieta sana, alla fortificazione dei prodotti alimentari di largo consumo, su base volontaria o su base obbligatoria. La fortificazione è stata la strategia seguita dal governo statunitense, adottata successivamente anche da Canada, Messico, Cile e altri paesi in via di sviluppo, e da Ungheria e Irlanda, quali unici rappresentanti delle nazioni dell'Europa occidentale.

Tra le argomentazioni a favore di una fortificazione obbligatoria degli alimenti viene citato il fatto che negli USA, anche in seguito ad una esposizione a multivitaminici da parte di più di 1 miliardo di anni-persona, non risulta aggravata l'anemia da carenza di vitamina B₁₂ (9).

La scelta da adottare risulta fortemente condizionata anche dai potenziali effetti avversi perché, se da una parte è stata osservata una possibile riduzione dell'incidenza di alcuni tipi di tumore, come il neuroblastoma nei bambini da madri esposte a fortificazione con acido folico (17), dall'altra è stato segnalato il rischio che la forma sintetica dell'acido folico possa mascherare i sintomi della mancanza di vitamina B₁₂, in particolare nella popolazione anziana (18). Oltre a ciò, l'acido folico sarebbe in grado di esacerbare i danni neurologici causati dalla mancanza di vitamina B₁₂ (19).

Un aumento di nascite gemellari in seguito all'assunzione di preparati multivitaminici o di acido folico è stato segnalato da parte di alcuni studi (20-24), anche nella fecondazione in vitro (25), anche se i risultati ottenuti dovrebbero essere supportati da ulteriori studi, soprattutto a causa di limiti rappresentati dalla mancanza di informazione sul tipo di integratore vitaminico utilizzato, o dalla bassa percentuale di donne che utilizzavano acido folico (22).

L'uso di acido folico è stato anche correlato ad un incremento di abortività spontanea (26-27).

Relativamente ai tumori, accanto ad un'azione preventiva dell'acido folico nell'insorgenza di nuovi tumori nei soggetti privi di lesioni pre-maligne, viene riportata anche la possibilità che i folati determinino un aumento nello sviluppo e nella progressione di lesioni, pre-maligne e maligne non diagnosticate, già esistenti (28).

Anche se persistono motivi di preoccupazione sui possibili effetti negativi di un'eccessiva assunzione di acido folico, sia mediante alimenti fortificati, che con la supplementazione, non sono state ancora fornite prove certe, riguardo ad effetti avversi definitivi. D'altra parte, ciò potrebbe essere dovuto anche ad un monitoraggio non sufficientemente completo di questi effetti.

La traduzione nella pratica delle raccomandazioni può essere realizzata mediante l'assunzione di acido folico dai cibi fortificati, su base volontaria od obbligatoria, o mediante la supplementazione. Al fine di rendere più efficaci queste raccomandazioni dovrebbero essere condotte campagne per aumentare le conoscenze e l'uso periconcezionale tra le donne in età fertile (29).

Nei paesi occidentali, la percentuale di donne che hanno sentito parlare di acido folico, o che conoscono il suo effetto preventivo nei confronti dei DTN, così come il periodo durante il quale l'assunzione di acido folico risulta efficace, è molto variabile ed è associata ad un livello di istruzione elevato, alla programmazione della gravidanza, all'età più avanzata, alla razza bianca, al reddito più elevato (30).

L'uso di supplementi vitaminici può assicurare le quantità adeguate nel periodo di maggior bisogno, tuttavia è da considerare che esso può essere nella pratica utilizzato solo da una parte, ancorché significativa, della popolazione target (ad esempio in Italia la percentuale delle gravidanze programmate viene stimata tra il 50 e il 70% dei nati).

D'altra parte occorre anche considerare che la stragrande maggioranza delle donne gravide assume acido folico, anche in dosi elevate, durante il corso della gravidanza, in periodi diversi dalla finestra di suscettibilità (periodo periconcezionale) (31).

Sul versante della ricerca genetica, tra le moltissime linee di attività in rapido sviluppo, riteniamo utile segnalare il crescente interesse per i geni che codificano gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati, in particolare il gene MTHFR, localizzato sul cromosoma 1, che codifica l'enzima 5,10-metilentetraidrofolato redattasi (i due polimorfismi che riducono l'efficienza in vitro di questo enzima sono C677T e A1298C). Recentemente è stata avanzata l'ipotesi che un'aumentata assunzione di acido folico nel periodo periconcezionale potrebbe determinare una selezione genetica, migliorando la sopravvivenza degli embrioni con la mutazione MTHFR 677C->T, in grado di fare aumentare le concentrazioni di omocisteina, qualora l'assunzione di folati venisse successivamente limitata nel bambino (32).

Su questi temi è impegnato dal 2004 il Network Italiano Promozione Acido Folico per la Prevenzione Primaria di Difetti Congeniti (33). Questa rete collaborativa è coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ed è supportata, ad oggi, da 162 organizzazioni operanti in Italia. Il suo obiettivo è quello di promuovere, tra le donne in età fertile, l'assunzione di acido folico in epoca periconcezionale, cioè nel periodo compreso tra un mese prima e il primo trimestre dopo il concepimento. La dose di acido folico sintetico consigliata per la riduzione del rischio di malformazioni congenite, in seguito alla raccomandazione che è stata approvata nel 2004, è di 0,4 mg/die, in aggiunta alla dose di 0,2 mg che viene assunta giornalmente, in media, con l'alimentazione. La dose deve essere aumentata a 4-5 mg/die in caso di precedenti nascite o familiarità con DTN o altre malformazioni, e in caso di madre affetta da epilessia o diabete, a causa del maggiore fabbisogno di folati.

Il presente contributo si propone di offrire dati aggiornati di distribuzione e di tendenza dell'occorrenza di malformazioni congenite riconosciute o ipotizzate sensibili all'acido folico, rilevati dai registri delle malformazioni congenite operanti in alcune regioni italiane, al duplice scopo di valutare lo stato del fenomeno negli anni recenti e di rendere disponibili linee di base necessarie per sorvegliarne i cambiamenti nel prossimo futuro.

Registri dei difetti congeniti in Italia

I Registri dei Difetti Congeniti (RDC) che sono attivi, ad oggi, in Italia sono i seguenti:

- Registro Lombardia;
- Registro Nord-Est Italia (NEI);
- Indagine sulle Malformazioni congenite in Emilia Romagna (IMER);
- Registro Toscano Difetti Congeniti (RTDC);
- Registro Campano Difetti Congeniti (RCDC);
- Indagine Siciliana Malformazioni Congenite (ISMAC).

Il totale di questi Registri sorveglia approssimativamente il 45% delle nascite in Italia, per un totale di circa 200.000 nati/anno.

Seguono le descrizioni aggiornate dei RDC che hanno partecipato allo studio.

In Appendice E sono riportati alcuni riferimenti bibliografici relativi a ciascun Registro.

Registro Nord-Est Italia (NEI)

Nel 1981 è stato istituito un registro Veneto il cui compito è quello di rilevare tutte le anomalie congenite nei nati vivi e morti e, a partire dal 1988, delle interruzioni volontarie di gravidanza (IVG). Successivamente, tale registro viene denominato NEI (Nord-Est Italia) in quanto entrano a far parte nel 1983 anche il Friuli Venezia Giulia e, nel 1990, il Trentino Alto Adige.

A partire dal 1985 il registro del Nord-Est entra a far parte del registro europeo (EUROCAT) e di quello internazionale (Clearinghouse) dal 1997.

Inizialmente il rilevamento delle malformazioni congenite era solo neonatale e limitato alle malformazioni evidenti nei primi 7 giorni di vita. Successivamente tale periodo di osservazione si è esteso al prenatale e postnatale, in modo particolare per le anomalie oculari e cardiovascolari, rispettivamente nel luglio 1990 e nello stesso mese del 1992.

Il rilevamento in età pediatrica (sino al terzo anno di vita) viene svolto dagli specialisti (oculisti e cardiologi) per quelle malformazioni non segnalate alla nascita o, semplicemente, per l'integrazione delle informazioni date precedentemente.

A partire dal 1 gennaio 2000 si rilevano tutte le anomalie, fatta eccezione per la lista di esclusione stesa dall'EUROCAT. Quest'ultime non vengono riportate se isolate, ma segnalate, al contrario, nel caso in cui siano in associazione con altre malformazioni.

Dall'aprile 1988 si è cominciato a registrare le malformazioni identificate in epoca fetale e per le quali si è interrotta la gravidanza, secondo la legge 194/78.

Il registro utilizza schede di rilevamento differenti per le varie attività epidemiologiche, e un fascicolo guida per la descrizione di ogni singola malformazione da segnalare.

Queste informazioni vengono, però, integrate con i dati presenti all'interno delle schede di dimissione ospedaliera (SDO) per le malformazioni, i quali vengono controllati verificandone la presenza nell'archivio o ricorrendo direttamente alla cartella clinica del singolo paziente. Queste fonti, utilizzate contemporaneamente, permettono di ridurre al minimo la sottototificazione e completare il quadro clinico con ulteriori informazioni come ad esempio specificare se la malformazione risulta essere isolata o è parte di un quadro sindromico.

Un'ulteriore fonte utilizzata dal registro per ottenere una prevalenza esatta delle malformazioni congenite tra i nati nel Nord-Est è il riepilogo mensile: ogni mese viene compilato, da parte degli ospedali, un riepilogo in cui viene specificato il numero totale dei parti, dei nati (vivi e morti) e dei parti gemellari anche se non è nato alcun bambino con un'anomalia.

La collaborazione di tutti gli ospedali delle regioni di interesse è volontaria, e si ottiene mediante la compilazione di due schede preparate rispettivamente per la registrazione neonatale e la registrazione delle gravidanze interrotte in modo volontario.

Gli scopi principali del registro sono:

- disporre di valori di riferimento necessari per il confronto di frequenza di una o più anomalie;
- il monitoraggio e l'istituzione di una banca dati aggiornata delle malformazioni congenite;
- la conoscenza dello spettro clinico di ogni malformazione;

- la costituzione di un centro di riferimento per la diagnosi e cura delle persone affette e per la valutazione dell'impatto delle misure preventive esercitate sulla popolazione.

I servizi che vengono forniti dal registro NEI sono:

- *sorveglianza delle malformazioni congenite*: ogni anno viene controllata la prevalenza alla nascita delle malformazioni congenite;
- *relazione annuale*: si rappresentano, annualmente, i risultati dell'anno precedente;
- *banca dati*: i dati raccolti sono disponibili in forma anonima e come tabulati per coloro che collaborano all'indagine; disponibili anche in forma completa, ma limitatamente a quelli che vengono inviati;
- *servizio di consulenza*: consulenze di tipo bibliografico (si invia il risultato della ricerca bibliografica), diagnostico (si invia la documentazione relativa con parere diagnostico e bibliografia più recente), genetico (presso il Servizio di Genetica Clinica ed Epidemiologica di Padova);
- *servizio di informazione teratologica*.

Registro Emilia Romagna (IMER)

Il Registro ha iniziato l'attività nel 1978 con l'adesione volontaria di pochi centri collaboranti interessando negli anni tutti i punti nascita della Regione. Dal 1980 Il Registro è riconosciuto e finanziato dalla Regione Emilia Romagna. Dal 2003 vi è una stretta collaborazione con il Servizio Sistema informativo Sanità e Politiche Sociali della regione Emilia Romagna per l'integrazione dei flussi informativi regionali (in particolare il Certificato di assistenza al Parto – CedAP e Schede di dimissione Ospedaliera – SDO).

Dal 2004 è stato stabilito un collegamento con la rete regionale dei Servizi di Genetica Medica (allo scopo di completare i dati sulla patologia malformativa genetica sindromica, e cromosomica diagnosticata all'interno della rete).

Nel 1980 il Registro IMER è entrato a far parte del Network europeo dei Registri delle malformazioni congenite (EUROCAT) e nel 1995 dell'*International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring System*.

Il Registro partecipa, inoltre, al coordinamento dei Registri italiani delle malformazioni congenite costituitosi presso l'ISS allo scopo di condividere le esperienze di vari registri, proporre linee di ricerca comuni, e produrre dati epidemiologici sulle malformazioni congenite a livello nazionale.

Il Registro si è dotato di un sito WEB che in maniera interattiva consente ai partecipanti non solo la visione dei dati epidemiologici globali ma fornisce anche la possibilità di produrre statistiche *ad hoc*.

Al Registro collaborano volontariamente ostetrici, neonatologi, pediatri, anatomopatologi della regione. I referenti compilano una scheda appositamente preparata per le malformazioni identificate in gravidanza, o nel nato entro la prima settimana di vita. Dal 1996 i centri partecipanti inviano dati relativi alle interruzioni terapeutiche di gravidanza a seguito del rilievo di anomalie fetali. Recentemente il Registro collabora con il sottogruppo nati-mortalità costituitosi in Regione Emilia Romagna all'interno della Commissione Nascita.

Registro Toscano Difetti Congeniti (RTDC)

In Toscana l'attività di rilevazione dei difetti congeniti è stata avviata nel 1979 sui nati da madre residente nella provincia di Firenze. Nello stesso anno il Registro è diventato membro di EUROCAT, il Network europeo di sorveglianza delle anomalie congenite. A partire dal 1992, la

registrazione è stata estesa a tutta la regione, con una copertura di circa il 95% delle attuali 26.000 nascite annuali. Dal 1997 il Registro Toscano Difetti Congeniti (RTDC) è diventato membro dell'*International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research* (ICBDSR).

Il RTDC è un registro su base di popolazione residente che ha come oggetto di registrazione i nati vivi, le morti fetali e gli aborti spontanei dalla 20esima settimana di età gestazionale, e le IVG di qualsiasi età gestazionale.

Il RTDC si avvale di una rete di referenti che operano in tutte le strutture pubbliche della regione e le cliniche convenzionate, sia presso le Unità Operative di Neonatologia, Ostetricia-Ginecologia e Pediatria, sia presso altri servizi coinvolti (anatomia patologica, cardiologia pediatrica, genetica medica, citogenetica).

Registro Campano Difetti Congeniti (RCDC)

In Campania l'attività di rilevazione e registrazione dei difetti congeniti è iniziata nel 1991 con la partecipazione di 38 ospedali e una copertura di circa il 60% dei nati. Dal 1994 il Registro Campano Difetti Congeniti (RCDC) è l'organo ufficiale della Regione Campania di rilevazione dei difetti congeniti.

Il registro ha incrementato la sua copertura gradualmente fino a superare il 70-80% dei nati fino all'anno 2001. Dal 2002 in poi il Registro, ufficialmente in link con il registro regionale delle nascite, virtualmente copre il 100% dei nati in Regione, con la partecipazione di tutti i luoghi di parto.

Nella rilevazione sono inclusi i nati morti con difetti congeniti e le interruzioni volontarie di gravidanza in seguito alla diagnosi prenatale.

Dal 1996 il Registro Campano dei Difetti Congeniti è diventato membro dell'*International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research* (ICBDSR) e dal 1997 dell'EUROCAT, network europeo di sorveglianza delle anomalie congenite.

Il network campano comprende referenti delle strutture pubbliche e non delle Unità Operative di Neonatologia, Pediatria e Ostetricia, oltre a referenti appartenenti ad Unità Operative specialistiche (cardiologi e chirurghi pediatri, ecografisti, anatomo-patologi, citogenetisti e genetisti).

Indagine Siciliana Malformazioni Congenite (ISMAC)

Il Registro ISMAC (Indagine Siciliana Malformazioni Congenite) è nato nel 1991 per volontà di Pediatri, Ostetrici, Neonatologi, Chirurghi Pediatri della Sicilia. L'ISMAC è organizzata su base volontaria e si propone di coprire l'intera area regionale siciliana, con un numero di nati per anno in Sicilia attualmente compreso fra 60.000 e 70.000; la percentuale di copertura che si è innalzata nei vari anni di attività è differente da provincia a provincia ed è attualmente superiore al 95% dei nati.

Il sistema di rilevazione dei dati si basa su una rete di Unità Operative o Centri di rilevamento, di primo livello (punti nascita) e di secondo livello (Reparti di pediatria, chirurgia pediatrica, ecc.) dove vengono osservati e rilevati i casi affetti da malformazioni congenite. Non è previsto ad oggi un sistema di raccolta dati inerenti a controlli sani.

Il flusso informativo prevede la compilazione delle schede da parte dei punti nascita e dei centri di secondo livello, con la diagnosi prenatale o neonatale o postnatale di MC, notizie sul soggetto in esame, sulla madre, sulla gravidanza relativa ed eventuali precedenti, sul padre, sulla famiglia e, in una scheda a parte, il riepilogo mensile dei nati.

Le schede, su supporto cartaceo, vengono quindi fatte confluire al Centro di Coordinamento Regionale, dove vengono trasferite in supporto informatico. Dopo l'informatizzazione dei dati, si provvede alla codifica delle UO e delle malformazioni (ad opera di un genetista medico) utilizzando le codifiche internazionali. Dal 2000 è attivo un flusso informativo in collaborazione con l'OER Siciliano per la sorveglianza delle malformazioni congenite che vanno incontro ad interruzione volontaria di gravidanza.

L'ISMAC è membro di EUROCAT e ICBDMMS e partecipa attivamente a numerosi progetti di ricerca nazionali e internazionali in collaborazione con gli altri Registri. Particolare attenzione in questi anni è stata rivolta alla sorveglianza di aree ad alto rischio ambientale (Gela e Augusta).

L'attività del Registro è supportata dall'ASMAL (Associazione Siciliana Malformazioni Congenite).

Materiali e metodi

Nel presente rapporto sono utilizzati dati relativi alla registrazione di:

- nati vivi con MC che può essere stata diagnosticata alla nascita, in epoca prenatale o in periodo postnatale;
- morti fetali con età gestazionale maggiore di 20 settimane;
- interruzioni volontarie di gravidanza a seguito di diagnosi prenatale di MC entro la 24^a settimana di età gestazionale, che si sono verificati nel periodo 1996-2002.

Nella Tabella 1 viene riportata l'informazione sui dati resi disponibili da parte di ciascun registro che ha aderito allo studio. Per il registro ISMAC della Sicilia Orientale i dati relativi alle IVG erano assenti fino al 2000 e incompleti dal 2001, per cui sono stati esclusi dalle analisi.

Per i registri su base di popolazione, è stata attivata una procedura di recupero dei casi da madre residente che sono nati fuori regione in zone sorvegliate dagli altri registri partecipanti allo studio, mentre i casi da madre residente fuori regione sono stati esclusi.

I registri su base ospedaliera registrano tutti i casi, residenti e non, nell'area sorvegliata.

Tabella 1. Informazioni sui dati disponibili sulle MC nel periodo 1996-2002, per ciascun Registro

Registro	MC	
	Alla nascita	Nelle IVG
NEI	X	X
IMER	X	X
RTDC	X	X
RCDC	X	X
ISMAL	X	-

I denominatori utilizzati per il calcolo dei tassi di prevalenza (numero totale di nascite nella popolazione di riferimento), sono stati forniti da ciascun Registro, relativamente al periodo analizzato (Tabella 2). Da rilevare la costanza del numero di nascite sorvegliate annualmente dai diversi registri, l'incremento nel 2002 e l'elevato numero complessivo su tutto il periodo.

Tabella 2. Nascite annuali per Registro

Registro	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	1996-2002
NEI	56.869	55.908	54.939	54.364	55.052	49.781	57.495	384.408
IMER	28.873	28.859	20.928	24.130	24.839	24.330	29.900	181.859
RTDC	24.606	25.216	25.468	26.060	26.618	26.381	26.593	180.942
RCDC	46.658	50.458	51.568	47.397	50.171	49.714	62.708	358.674
ISMAC	18.054	18.795	16.922	16.942	15.304	16.049	16.073	118.139
TOTALE	175.060	179.236	169.825	168.893	171.984	166.255	192.769	1.224.022

Le malformazioni congenite oggetto di studio da parte di tutti i registri sono state selezionate sulla base dell'effetto preventivo riconosciuto o ipotizzato per l'acido folico, secondo i riferimenti bibliografici citati nell'introduzione.

L'elenco delle MC è riportato nella Tabella 3. Per la definizione e codifica delle MC sono stati utilizzati i sistemi di classificazione ICD-9 (*International Classification of Diseases 9th Revision*) con l'estensione della BPA (*British Paediatric Association*), e la classificazione ICD-10 (*International Classification of Disease. 10th Revision*).

Tabella 3. Lista delle MC oggetto di studio con i relativi codici utilizzati (BPA-ICD9 e ICD10)

MC	Codici BPA-ICD9	Codici ICD10
Difetti tubo neurale	7400-7420	Q00, Q01, Q05
<i>Anencefalia</i>	7400.2-7400.4, 7401.1-7401.9	Q00
<i>Spina bifida</i>	7411.1-7419.9	Q05
<i>Encefalocele</i>	7420.11-7420.99	Q01
Malformazioni cardiovascolari	7450.0-7474.9	Q20-Q26
Schisi orali	7490-7492	Q35-Q37
<i>Palatoschisi</i>	7490	Q35
<i>Labio +/- palatoschisi</i>	7491-7492	Q36-Q37
Difetti riduzione arti	7552-7554, 7556	Q71-Q73
Atresia/stenosi ano-rettale	7512.1-7512.4	Q42.0-Q42.3
Anomalie apparato urinario	7530-7539	Q60-Q64
Onfalocele	7567.0	Q79.2

Le variabili incluse nella base dei dati per ciascun soggetto con MC sono riportate nella Tabella 4. Nella fase iniziale dello studio i dati provenienti dai diversi registri sono stati omogeneizzati secondo quanto riportato nella stessa Tabella 4.

Tabella 4. Variabili del dataset di base

Variabili	Unità di misura o classificazione
Nome Registro	NEI / IMER / RTDC / RCDC / ISMAC
Codice identificativo locale	
Anno nascita	aaaa
Tipo di evento	nato vivo / nato morto / IVG / aborto spontaneo
Parto singolo o multiplo	numero nati
Sesso	M=1 / F=2 / Indeterminato=3
Età gestazionale	numero settimane
Peso alla nascita	grammi
Comune di residenza	codice ISTAT
Età materna	anni
MC	codice BPA- ICD9 o ICD10 + descrizione in testo
Modalità presentazione MC	Isolata / Multipla / Condizione nota / Cromosomica

Per il registro NEI dal 2000 è in corso una integrazione della casistica mediante procedura di *linkage* con l'archivio delle schede di dimissione ospedaliera (SDO).

Le MC possono essere classificate come: isolate, nel caso in cui non siano presenti altre MC, oppure associate, se in presenza di due o più anomalie indipendenti. I casi associati vengono ulteriormente suddivisi in condizioni note (sindromi, associazioni, sequenze), cromosomiche e multiple di origine sconosciuta. Ciascun caso può essere classificato in una sola categoria.

I soggetti multimalformati possono essere rappresentati più volte nel dataset e nelle tabulazioni, nel caso di presenza contemporanea di più MC oggetto di studio. Per l'esatta definizione dei casi multipli, cromosomici e delle condizioni note sono stati verificati automaticamente e, nei casi dubbi, mediante controllo manuale, i codici e la descrizione in testo delle diagnosi. Nel caso in cui siano stati riportati più codici specifici riconducibili alla stessa MC, il soggetto viene definito come isolato e quindi risulta presente un'unica volta nel dataset.

Come misura di frequenza viene presentato il tasso di prevalenza totale, rappresentato dal rapporto tra il totale dei casi con MC (nati vivi, morti fetali e IVG) osservati e il totale dei nati (vivi e morti) registrati nello stesso periodo.

Le IVG non sono comprese nel denominatore a causa della scarsa disponibilità di statistiche appropriate ma questo non modifica sostanzialmente la stima del tasso vero, essendo le interruzioni a seguito di diagnosi di malformazione fetale numericamente esigue rispetto al totale delle nascite.

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software statistico Stata (versione 8.0).

Risultati dello studio

Vengono presentati i seguenti risultati:

- prevalenze di base (*baseline*) totali (nati + IVG);
- distribuzione delle MC per sesso;
- distribuzione delle MC per tipo di evento (nato vivo/nato morto/aborto spontaneo/IVG);
- distribuzione per tipo di associazione (isolata, multipla, cromosomica, condizione nota);
- distribuzione per peso ed età gestazionale nei nati;
- distribuzione per età materna nei casi totali.

Prevalenze di base (*baseline*) totali (nati+IVG)

Per ogni registro viene riportata la frequenza osservata tra i nati, le IVG e i casi totali, (nati+IVG), la prevalenza totale e il relativo intervallo di confidenza al 95% (IC95%), per ciascuna MC e gruppo di MC esaminati. I casi osservati tra gli aborti spontanei sono stati esclusi dalle tabulazioni.

Per i Registri NEI (Tabella 5), IMER (Tabella 6), RTDC (Tabella 7), RCDC (Tabella 8) le informazioni disponibili sia per i nati che per le IVG consentono di valutare l'impatto quantitativo dei casi diagnosticati in epoca prenatale.

Come precedentemente segnalato, per il Registro ISMAC (Tabella 9) la disponibilità dei dati sulle IVG risulta parziale, da cui la scelta di escludere questi eventi dalle analisi condotte, sia sui soli casi del registro siciliano, che sui casi totali.

In Appendice A sono riportati gli andamenti delle prevalenze annuali sul totale dei casi, comprensivi di nati e IVG.

Tabella 5. NEI: frequenza e prevalenza per 9 MC (periodo 1996-2002)

MC	Nati n.	IVG n.	Totale n.	Prevalenza x 10.000	IC 95%
Anencefalia	13	62	75	1,95	1,51 - 2,39
Spina bifida	66	71	137	3,56	2,97 - 4,16
Encefalocele	7	23	30	0,78	0,50 - 1,06
Malformazioni cardiovascolari	2.780	131	2.911	75,73	72,99 - 78,47
Schisi orali	426	54	480	12,49	11,37 - 13,60
Difetti riduzione arti	155	37	192	4,99	4,29 - 5,70
Atresia/stenosi ano-rettale	103	16	119	3,10	2,54 - 3,65
Anomalie apparato urinario	626	80	706	18,37	17,01 - 19,72
Onfalocele	22	32	54	1,40	1,03 - 1,78

Tabella 6. IMER: frequenza e prevalenza per 9 MC (periodo 1996-2002)

MC	Nati n.	IVG n.	Totale n.	Prevalenza x 10.000	IC 95%
Anencefalia	8	27	35	1,92	1,29 - 2,56
Spina bifida	22	40	62	3,41	2,56 - 4,26
Encefalocele	4	8	12	0,66	0,29 - 1,03
Malformazioni cardiovascolari	1.002	117	1.119	61,53	57,94 - 65,13
Schisi orali	175	14	189	10,39	8,91 - 11,87
Difetti riduzione arti	62	14	76	4,18	3,24 - 5,12
Atresia/stenosi ano-rettale	40	12	52	2,86	2,08 - 3,64
Anomalie apparato urinario	427	76	503	27,66	25,24 - 30,07
Onfalocele	14	20	34	1,87	1,24 - 2,50

Tabella 7. RTDC: frequenza e prevalenza per 9 MC (periodo 1996-2002)

MC	Nati n.	IVG n.	Totale n.	Prevalenza x 10.000	IC 95%
Anencefalia	3	33	36	1,99	1,34 - 2,64
Spina bifida	19	43	62	3,43	2,57 - 4,28
Encefalocele	5	8	13	0,72	0,33 - 1,11
Malformazioni cardiovascolari	1.455	54	1.509	83,40	79,21 - 87,59
Schisi orali	163	22	185	10,22	8,75 - 11,70
Difetti riduzione arti	76	17	93	5,14	4,10 - 6,18
Atresia/stenosi ano-rettale	38	5	43	2,38	1,67 - 3,09
Anomalie apparato urinario	394	51	445	24,59	22,31 - 26,88
Onfalocele	11	16	27	1,49	0,93 - 2,06

Tabella 8. RCDC: frequenza e prevalenza per 9 MC (periodo 1996-2002)

MC	Nati n.	IVG n.	Totale n.	Prevalenza x 10.000	IC 95%
Anencefalia	19	82	101	2,82	2,27 - 3,37
Spina bifida	57	45	102	2,84	2,29 - 3,40
Encefalocele	12	22	34	0,95	0,63 - 1,27
Malformazioni cardiovascolari	1.504	217	1.721	47,98	45,72 - 50,24
Schisi orali	337	22	359	10,01	8,97 - 11,04
Difetti riduzione arti	139	22	161	4,49	3,80 - 5,18
Atresia/stenosi ano-rettale	95	12	107	2,98	2,42 - 3,55
Anomalie apparato urinario	458	109	567	15,81	14,51 - 17,11
Onfalocele	25	44	69	1,92	1,47 - 2,38

Tabella 9. ISMAC: frequenza e prevalenza per 7 MC (periodo 1996-2002)

MC	Nati n.	IVG n.	Totale n.	Prevalenza x 10.000	IC 95%
Difetti tubo neurale	38	n.d.	38	3,22	2,19 - 4,24
Malformazioni cardiovascolari	780	n.d.	780	66,02	61,41 - 70,64
Schisi orali	130	n.d.	130	11,00	9,11 - 12,89
Difetti riduzione arti	30	n.d.	30	2,54	1,63 - 3,45
Atresia/stenosi ano-rettale	31	n.d.	31	2,62	1,70 - 3,55
Anomalie apparato urinario	180	n.d.	180	15,24	13,01 - 17,46
Onfalocele	12	n.d.	12	1,02	0,44 - 1,59

Distribuzione per sesso

Nella Tabella 10 è riportata la distribuzione per sesso, delle MC osservate sul totale dei registri.

La sex-ratio, calcolata tramite il rapporto tra il numero dei maschi e il numero delle femmine (M/F), è corredata del relativo intervallo di confidenza al 95%.

Per tutte le MC studiate, ad esclusione delle *malformazioni cardiovascolari*, si evidenziano eccessi statisticamente significativi a favore del sesso maschile, in ordine decrescente di sbilanciamento, per le *anomalie dell'apparato urinario*, l'*atresia/stenosi ano-rettale* e l'*onfalocele*. Per le *malformazioni cardiovascolari* si registra una situazione di sostanziale parità tra sessi.

Tabella 10. Distribuzione delle MC per sesso con sex ratio e IC 95%

MC	M	F	Indet.	n.c.	Totale	M/F	IC 95%	
Anencefalia	n.	81	76	14	77	248	1,07	1,02 - 1,12
	%	32,7	30,6	5,6	31,0	100,0		
Spina bifida	n.	169	142	9	44	364	1,19	1,1 - 1,2
	%	46,4	39,0	2,5	12,1	100,0		
Encefalocele	n.	42	32	4	11	89	1,31	1,2 - 1,5
	%	47,2	36,0	4,5	12,4	100,0		
Difetti tubo neurale	n.	310	270	27	132	739	1,15	1 - 1,3
	%	41,9	36,5	3,7	17,9	100,0		
Malform. cardiovascolari	n.	3.956	3.938	14	135	8.043	1,00	1 - 1,1
	%	49,2	49,0	0,2	1,7	100,0		
Schisi orali	n.	733	593	7	12	1.345	1,24	1,18 - 1,3
	%	54,5	44,1	0,5	0,9	100,0		
Difetti riduzione arti	n.	301	228	8	16	553	1,32	1,2 - 1,4
	%	54,4	41,2	1,4	2,9	100,0		
Atresia/stenosi ano-rettale	n.	217	123	4	8	352	1,76	1,6 - 1,9
	%	61,6	34,9	1,1	2,3	100,0		
Anomalie apparato urinario	n.	1.599	704	19	83	2.405	2,27	2,2 - 2,4
	%	66,5	29,3	0,8	3,5	100,0		
Onfalocele	n.	99	59	4	36	198	1,68	1,5 - 1,92
	%	50,0	29,8	2,0	18,2	100,0		

Indet.: Sesso indeterminato; n.c.: non conosciuto

Distribuzione per tipo di evento

La Tabella 11 mostra la grande variabilità tra condizioni relativamente all'impatto della diagnosi prenatale seguita da interruzione di gravidanza: per l'*onfalocele* e il complesso dei

difetti del tubo neurale la quota percentuale di IVG rappresenta oltre il 60% dei casi totali (da 82,3% per l'*anencefalia* a 54,7% per la *spina bifida*), per le *schisi orofacciali*, le *anomalie dell'apparato urinario* e l'*atresia/stenosi ano-rettale* la quota percentuale di IVG è inferiore al 15%, mentre le *schisi orali* e le *malformazioni cardiovascolari* sono rappresentate quasi esclusivamente da nati vivi.

Relativamente alla natimortalità, cioè al numero di nati morti sul totale dei nati, sono stati osservati valori superiori all'1% per l'*anencefalia* (6,0%), l'*encefalocele* (2,2%), i *difetti in riduzione degli arti* (1,4%) e l'*atresia/stenosi ano-rettale* (1,1%).

La natimortalità risulta invece dello 0,2% nei casi con *malformazioni cardiovascolari* e delle *anomalie dell'apparato urinario*.

Tabella 11. Distribuzione delle MC per tipo di evento

MC		NV	NM	AS	IVG	Totale
Anencefalia	n.	28	15	1	204	248
	%	11,3	6,0	0,4	82,3	100,0
Spina bifida	n.	162	2	1	199	364
	%	44,5	0,5	0,3	54,7	100,0
Encefalocele	n.	26	2	0	61	89
	%	29,2	2,2	0,0	68,5	100,0
Difetti tubo neurale	n.	254	19	2	464	739
	%	34,4	2,6	0,3	62,8	100,0
Malformazioni cardiovascolari	n.	7.506	16	2	519	8.043
	%	93,3	0,2	0,0	6,5	100,0
Schisi orali	n.	1.220	11	2	112	1.345
	%	90,7	0,8	0,1	8,3	100,0
Difetti riduzione arti	n.	454	8	1	90	553
	%	82,1	1,4	0,2	16,3	100,0
Atresia/stenosi ano-rettale	n.	303	4	0	45	352
	%	86,1	1,1	0,0	12,8	100,0
Anomalie apparato urinario	n.	2.079	6	4	316	2.405
	%	86,4	0,2	0,2	13,1	100,0
Onfalocele	n.	82	2	2	112	198
	%	41,4	1,0	1,0	56,6	100,0

NV: Nati Vivi; NM: Nati Morti; AS: Aborti Spontanei; IVG: Interruzioni Volontarie di Gravidanza

Distribuzione per tipo di manifestazione della MC

Relativamente alla modalità di presentazione del difetto, alcune MC sono caratterizzate da una componente predominante di forme isolate, come l'*anencefalia* (87,9%) e le *malformazioni cardiovascolari* (81,3%). Le forme multiple risultano più rappresentate tra i casi con *atresia/stenosi ano-rettale* (38,6%), *onfalocele* (36,9%), *encefalocele* (28,1%), *difetti in riduzione degli arti* (24,2%). Le anomalie cromosomiche sono rappresentate nell'*onfalocele* (14,1%) e in misura minore nelle *malformazioni cardiovascolari* (6,3%), nelle *schisi orali* (5,6%), e nell'*atresia/stenosi ano-rettale* (5,1%). Le condizioni note sono presenti nell'*encefalocele* (9,0%), nei *difetti in riduzione degli arti* (8,7%), nell'*atresia/stenosi ano-rettale* (5,4%) e nelle *schisi orali* (5,3%) (Tabella 12).

Nell'Appendice B (Figure B1-B6) sono riportati i diagrammi a barre relativi alla distribuzione delle MC secondo la modalità di presentazione (isolata, multipla, cromosomica, condizione nota) per Registro.

Tabella 12. Distribuzione delle MC per associazione della MC

MC		Associazione				Totale
		I	M	C	CN	
Anencefalia	n.	218	22	6	2	248
	%	87,9	8,9	2,4	0,8	100,0
Spina bifida	n.	282	57	15	10	364
	%	77,5	15,7	4,1	2,7	100,0
Encefalocele	n.	53	25	3	8	89
	%	59,6	28,1	3,4	9,0	100,0
Difetti tubo neurale	n.	583	112	24	20	739
	%	78,9	15,2	3,2	2,7	100,0
Malformazioni cardiovascolari	n.	6.535	867	504	137	8.043
	%	81,3	10,8	6,3	1,7	100,0
Schisi orali	n.	962	237	75	71	1.345
	%	71,5	17,6	5,6	5,3	100,0
Difetti riduzione arti	n.	354	134	17	48	553
	%	64,0	24,2	3,1	8,7	100,0
Atresia/stenosi ano-rettale	n.	179	136	18	19	352
	%	50,9	38,6	5,1	5,4	100,0
Anomalie apparato urinario	n.	1.807	430	80	88	2.405
	%	75,1	17,9	3,3	3,7	100,0
Onfalocele	n.	91	73	28	6	198
	%	46,0	36,9	14,1	3,0	100,0

I. Isolata; M: Multipla; C: Cromosomica; CN: Condizioni note (sindromi, sequenze, associazioni)

Distribuzione per peso ed età gestazionale nei nati e per età materna nei casi totali

Nella Tabella 13 sono riportati media (μ) e deviazione standard (DS) del peso e dell'età gestazionale per i casi con MC alla nascita. I *difetti del tubo neurale*, in particolare l'*anencefalia*, sono caratterizzati da un basso peso medio in tutte le categorie inferiori alle 39 settimane, e da una minore età gestazionale media (rispettivamente 36,8 e 36,1 settimane). L'età media materna, calcolata sul totale dei casi, è compresa nell'intervallo il cui estremo inferiore è pari a 28,2 anni per i *difetti del tubo neurale* e l'estremo superiore è 31,6 anni per l'*onfalocele*.

Tabella 13. Peso medio (in grammi), età gestazionale media, età materna media per MC

MC	Peso dei casi alla nascita per EG								EG dei casi nati		Età madre casi totali	
	<34 sett.		34-36 sett.		37-38 sett.		≥39 sett.		μ	DS	μ	DS
	μ	DS	μ	DS	μ	DS	μ	DS				
Anencefalia	960,4	532,7	1.618,0	975,8	2.501,7	841,8	2.805,5	423,6	36,1	3,8	30,1	5,4
Spina bifida	1.049,8	379,7	2.419,6	352,8	2.886,5	513,2	3.263,9	441,6	37,7	3,4	30,6	5,4
Encefalocele	1.195,0	714,2	2.212,5	380,0	3.350,0	282,8	3.152,0	448,5	37,6	4,0	29,9	5,5
Difetti tubo neurale	1.276,7	412,9	1.830,0	364,6	2.638,9	433,4	3.338,5	467,6	36,8	3,7	28,2	6,4
Malf. cardiovascolari	1.543,8	617,4	2.432,7	595,6	2.992,0	541,8	3.346,0	502,4	38,3	2,5	30,7	5,3
Schisi orali	1.513,6	712,3	2.290,0	544,3	2.940,1	495,6	3.321,0	459,4	38,6	2,5	30,5	5,4
Difetti riduzione arti	1.412,1	577,5	2.261,4	495,5	2.850,2	515,6	3.245,0	508,3	38,3	2,8	30,6	5,1
Atresia/sten. ano-retto	1.454,7	793,8	2.082,1	487,4	2.871,9	519,9	3.195,9	463,9	38,0	2,9	30,1	5,3
Anomalie urinarie	1.589,6	560,3	2.494,3	535,2	3.053,1	542,9	3.396,8	481,7	38,4	2,4	30,5	5,2
Onfalocele	1.925,0	703,0	2.433,3	545,3	2.767,9	719,8	3.173,0	645,0	37,8	2,3	31,6	5,3

EG: Età gestazionale; μ : media; DS: deviazione standard.

Analisi delle prevalenze

Obiettivi, materiali e metodi

Le differenze tra registri, tra anni e l'interazione tra registri e anni sono state analizzate mediante modelli lineari generalizzati, con distribuzione poissoniana della variabile dipendente, e sono state analizzate mediante Statistica Rapporto di Verosimiglianza (SRV).

Le analisi sono state effettuate sui soli nati con MC, osservati dal complesso dei registri e sui casi totali (nati + IVG) con MC, osservati da 4 Registri, con l'esclusione del registro ISMAC, a causa della parziale disponibilità di dati sulle IVG.

Gli obiettivi delle analisi sono:

- individuare andamenti temporali delle MC studiate;
- pervenire ad una stima valida della prevalenza *baseline* delle MC sensibili all'azione preventiva dell'acido folico, nel caso di situazione di omogeneità riscontrata tra tutti i registri partecipanti al progetto, rappresentativi della situazione esistente in Italia.

Nella Tabella 14 sono riportate le prevalenze alla nascita corredate del relativo intervallo di confidenza al 95%, con informazioni relative all'eventuale eterogeneità esistente tra registri, anni e anni-registri.

Nella Tabella 15 sono riportate le stesse informazioni per i casi totali (nati + IVG).

Nella Tabella 16 è riportato il sommario dei risultati delle analisi di omogeneità e di andamento temporale per ciascun registro.

Nella Tabella 17 sono riassunte le condizioni di omogeneità od eterogeneità delle MC tra registri, anni o anni-registri e le motivazioni di queste condizioni derivate dai risultati riportati nelle Tabelle 14 e 15 e nelle Figure riportate in Appendice C.

Nella Tabella 18 sono presentate le prevalenze e le proporzioni nel complesso dei registri per le malformazioni per le quali è stata verificata assenza di eterogeneità tra registri e di interazione tra anni e registri.

Sulla base delle stime di prevalenza ottenute, nella Tabella 19 sono riportate le stime di casi attesi e di casi evitabili mediante utilizzo corretto di acido folico in tutte le gravidanze che esitano in una nascita. Per ottenere stime conservative sono stati utilizzati valori di efficacia preventiva collocati nella parte inferiore degli intervalli presenti in letteratura.

In Appendice A vengono presentati i grafici della prevalenza annuale, rispettivamente, alla nascita (Figure A1a-A10a) e totale (Figure A1b-A10b).

Nelle Figure C1-C10 riportate in Appendice C sono rappresentate graficamente le prevalenze totali e alla nascita, con i rispettivi intervalli di confidenza al 95%, delle MC per tutti i registri.

È da evidenziare che per il registro ISMAC sono rappresentate esclusivamente le prevalenze alla nascita, quindi non sono possibili confronti con gli altri registri relativamente al totale della casistica.

In Appendice D sono riportati, per ogni registro, i grafici dell'andamento temporale delle prevalenze, sia nei nati (Figure D1a-D10a), che totale (Figure D1b-D10b).

Risultati

Dalla Tabella 14 relativa ai nati risulta una eterogeneità statisticamente significativa tra registri per i *difetti del tubo neurale*, dovuta a differenze significative tra Campania e Sicilia rispetto alla Toscana (Figura C4).

Riguardo all'andamento tra anni, è stato individuato un trend decrescente comune per l'*encefalocele* e i *difetti del tubo neurale* (Figure A3a e A4a).

L'analisi dell'interazione anno-registro ha mostrato un risultato statisticamente significativo per le *malformazioni cardiovascolari*, per le quali si sono verificati decrementi significativi nei registri IMER, RTDC e RCDC e incrementi significativi nei registri NEI e ISMAC (Figura D5a) e le *anomalie dell'apparato urinario*, per le quali è emerso un trend decrescente nel registro IMER e trend crescenti nei registri NEI e ISMAC (Figura D9a).

Considerando il totale dei nati e delle IVG (Tabella 15), i difetti che sono risultati eterogenei tra Registri sono l'*anencefalia* (dalla Figura C1 si nota che l'eterogeneità è dovuta ad una prevalenza più elevata nell'RCDC) e le *schisi orali* (dalla Figura C6 si nota che l'eterogeneità è dovuta ad una prevalenza più elevata nel NEI).

Non sono stati evidenziati trend, mentre si conferma l'interazione significativa anno-registro osservata anche tra i soli nati per le *malformazioni cardiovascolari* e le *anomalie dell'apparato urinario* (Figure D5b e D9b).

Tabella 14. Totale registri: prevalenza alla nascita ed eterogeneità, 1996-2002

MC	Nati n.	Prevalenza x 10.000	IC 95%	Eterogeneità tra		
				registri	anni	anni/registri
Anencefalia	43	0,39	0,27 - 0,51	no	no	no
Spina bifida	164	1,48	1,26 - 1,71	no	no	no
Encefalocele	28	0,25	0,16 - 0,35	no	si	no
Difetti tubo neurale	273	2,23	1,97 - 2,49	si	si	no
Malformazioni cardiovascolari	7.521	61,44	60,06 - 62,83	n.v.	n.v.	si
Schisi orali	1.231	10,06	9,50 - 10,62	no	no	no
Difetti riduzione arti	462	3,77	3,43 - 4,12	no	no	no
Atresia/stenosi ano-rettale	307	2,51	2,23 - 2,79	no	no	no
Anomalie apparato urinario	2.085	17,03	16,30 - 17,76	n.v.	n.v.	si
Onfalocele	84	0,69	0,54 - 0,83	no	no	no

Tabella 15. Totale registri: prevalenza ed eterogeneità nei casi totali (nati+IVG), 1996-2002

MC	Nati n.	IVG n.	Totale n.	Prevalenza x 10.000	IC 95%	Eterogeneità tra		
						registri	anni	anni/ registri
Anencefalia	43	204	247	2,23	1,95 - 2,51	si	no	no
Spina bifida	164	199	363	3,28	2,94 - 3,62	no	no	no
Encefalocele	28	61	89	0,80	0,64 - 0,97	no	no	no
Difetti tubo neurale	273	464	737	6,02	5,59 - 6,46	no	si	no
Malformazioni cardiovascolari	7.521	519	8.040	65,69	64,25 - 67,12	n.v.	n.v.	si
Schisi orali	1.231	112	1.343	10,97	10,39 - 11,56	si	no	no
Difetti riduzione arti	462	90	552	4,51	4,13 - 4,89	no	no	no
Atresia/stenosi ano-rettale	307	45	352	2,88	2,58 - 3,18	no	no	no
Anomalie apparato urinario	2.085	316	2.401	19,62	18,83 - 20,40	n.v.	n.v.	si
Onfalocele	84	112	196	1,60	1,38 - 1,83	no	no	no

Da questi risultati, sintetizzati nella Tabella 16, emerge quindi una condizione di assenza di eterogeneità per tutte le MC, ad eccezione delle *malformazioni cardiovascolari* e delle *anomalie dell'apparato urinario*, sia per i nati che per i casi totali.

Tabella 16. Risultati delle analisi dell'omogeneità e dell'andamento temporale dei Registri

MC	Nati		Nati + IVG	
	Eterogeneità	Trend	Eterogeneità	Trend
Anencefalia	n.s.	n.s.	n.s.	NEI T- (*)
Spina bifida	n.s.	n.s.	NEI (**)	RCDC T- (*)
Encefalocele	n.s.	RTDC T- (*) RCDC T- (*)	n.s.	n.s.
Difetti tubo neurale	n.s.	RCDC T- (**)	n.s.	NEI T- (**)
Malformazioni cardiovascolari	n.s.	NEI T+ (***) IMER T- (**) RTDC T- (**) RCDC T- (***) ISMAC T+ (***)	IMER (**)	NEI T+ (***) RTDC T- (*) RCDC T- (***)
Schisi orali	n.s.	RCDC T- (*)	n.s.	RCDC T- (*)
Difetti riduzione arti	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Atresia/stenosi ano-rettale	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Anomalie apparato urinario	n.s.	NEI T+ (***) IMER T- (**) ISMAC T+ (***)	n.s.	NEI T+ (***)
Onfalocele	RCDC (*)	RTDC T+ (*)	n.s.	n.s.

n.s. = non significativo; (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001

Tabella 17. Condizione di omogeneità o eterogeneità delle MC tra registri, anni o registri-anni

MC	Note
<i>Omogeneità sia nei nati che nel totale dei casi (nati+IVG)</i>	
Anencefalia	Nel RCDC si osservano prevalenze più elevate, rispetto agli altri Registri, per i casi totali.
Spina bifida	Non si evidenziano differenze statisticamente significative tra Registri, né trend od interazioni anno-Registro.
Encefalocele	Tra i nati risulta un trend comune decrescente (p<0,01).
Difetti tubo neurale	Si osserva eterogeneità tra Registri nei nati a causa di una differenza significativa tra Sicilia e Toscana e tra Campania e Toscana. Tra i casi totali risulta un trend comune decrescente (p<0,05).
Schisi orali	Per il NEI si segnala una prevalenza media di periodo più elevata rispetto agli altri Registri.
Difetti riduzione arti	Nessuna differenza da segnalare.
Atresia/stenosi ano-rettale	Nessuna differenza da segnalare.
Onfalocele	Nessuna differenza da segnalare.
<i>Eterogeneità sia nei nati che nel totale dei casi (nati+IVG)</i>	
Malformazioni cardiovascolari	L'interazione anni-Registri è determinata dalla individuazione di un trend crescente (p<0,001) nel Registro NEI, accompagnato da trend decrescenti nei Registri RTDC e RCDC tra i casi totali; tra i soli nati, a questi trend decrescenti si aggiunge quello decrescente relativo al Registro IMER.
Anomalie apparato urinario	L'eterogeneità anni-Registri è attribuibile, tra i nati, ai trend crescenti altamente significativi dei Registri NEI e ISMAC (p<0,001) e al trend decrescente (p<0,001) nel Registro IMER. Tra i casi totali si conferma l'eterogeneità anni-Registri ed il trend crescente del registro NEI.

I risultati ottenuti dalle analisi di omogeneità od eterogeneità delle MC tra Registri, anni o anni-Registri e le motivazioni di queste condizioni derivate dai risultati riportati nelle Tabelle 14 e 15 e nelle Figure riportate in Appendice C, sono sintetizzati nella Tabella 17. L'assenza di eterogeneità, quando verificata, consente di utilizzare le frequenze, riportate in Tabella 18, come valide stime di prevalenza a livello nazionale. Il numero di casi evitabili ottenuti mediante stima conservativa (Tabella 19) risulta quantitativamente rilevante se si considerano la gravità, la sofferenza, i costi sanitari, sociali ed economici.

Tabella 18. Malformazioni congenite con omogeneità tra registri in assenza di interazione tra anni e registri

MC	Alla nascita		Nati + IVG	
	Prevalenza (*)	Proporzione	Prevalenza (*)	Proporzione
Anencefalia	0,39	1:25.641		
Spina bifida	1,48	1:6.757	3,28	1:3.049
Encefalocele	0,25	1:40.000	0,80	1:12.500
Difetti tubo neurale			6,02	1:1.661
Schisi orali	10,06	1:994		
Difetti riduzione arti	3,77	1:2.653	4,51	1:2.119
Atresia/stenosi ano-rettale	2,51	1:3.984	2,88	1:3.448
Onfalocele	0,69	1:14.493	1,60	1:6.024

(*) tasso per 10.000 nascite

Tabella 19. Stime di impatto preventivo mediante supplementazione con acido folico a tutte le donne nel periodo periconcezionale

MC	Prevalenza nei nati e IVG per 10.000	RRR% (1)	Casi attesi (2)	Riduzione casi/anno (3)
Difetti tubo neurale	6,02	35	343	120
Malformazioni cardiovascolari	65,69	20	3.744	749
Schisi orali	10,97	25	625	156
Difetti riduzione arti	4,51	30	257	77
Atresia/stenosi ano-rettale	2,88	20	164	33
Anomalie apparato urinario	19,62	30	1.118	336
Onfalocele	1,60	20	91	18
Totale			6.344	1.489

(1) RRR riduzione relativa del rischio; (2) casi attesi sulla base di 570.000 nascite/anno; (3) casi evitabili sulla base della RRR

Conclusioni

I risultati riportati e commentati nel presente rapporto rappresentano la conoscenza di base del profilo epidemiologico delle malformazioni congenite prevenibili mediante acido folico. La maggior parte delle condizioni considerate sono risultate omogenee tra i diversi registri delle malformazioni e nel corso dei sette anni considerati. Le *malformazioni cardiovascolari e dell'apparato urinario*, pur risultando complessivamente in aumento, hanno mostrato differenti andamenti nel tempo nei diversi registri, non permettendo di produrre stime stabili di livello nazionale. Questo può essere verosimilmente dovuto alla crescita differenziata della capacità

diagnostica. Per il complesso dei *difetti del tubo neurale* l'eterogeneità tra registri considerando i soli nati scompare se si aggiungono le interruzioni di gravidanza; per gli stessi difetti si osserva un andamento decrescente, sia nei soli nati, che nei casi totali, andamento non confermato analizzando i difetti specifici (*anencefalia* e *spina bifida*) ad eccezione dell'*encefalocele*. Questa tendenza, seppure risulti più evidente negli ultimi tre anni considerati, non sembra poter essere motivata da un incremento di uso di acido folico in periodo periconcezionale, in quanto riguarda ad oggi solo una modesta quota di tutte le gravidanze.

Per valutare l'efficacia di azioni preventive e in considerazione delle condizioni di bassa potenza statistica che caratterizzano il fenomeno (più elevata ed efficace per patologie a più bassa frequenza e viceversa), dovrà essere attivato un sistema di sorveglianza mirato e tempestivo. La stima delle centinaia di casi evitabili, molti dei quali portatori di anomalie gravi e invalidanti, ci consegnano un quadro ricco di possibilità ma anche denso di responsabilità: è proprio in questi casi che occorre riflettere sulle conseguenze del non fare!

Il Network Italiano sull'acido folico ha stimolato questo studio e altre iniziative come corollari di una azione principale tesa a promuovere con urgenza una politica di effettiva prevenzione indirizzata a tutti coloro che hanno responsabilità e interessi in materia: dai decisori, agli operatori del servizio sanitario, alle associazioni e ai singoli portatori di malattia.

Bibliografia

1. EUROCAT. *Instructions for the registration of congenital anomalies September 2005 (Guide 1.3)*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.eurocat.ulst.ac.uk/pdf/EUROCAT-Guide-1.3.pdf>; ultima consultazione 02/11/2006.
2. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *The Lancet* 1991;338:131-137.
3. Czeizel AE, Dudas I, Metneki J. Pregnancy outcomes in a randomised controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation. Final report. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 1994;255:131-9.
4. Bailey LB, Berry RJ. Folic acid supplementation and the occurrence of congenital heart defects, orofacial clefts, multiple births, and miscarriage. Review. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81(5):1213S-17S.
5. Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use. *American Journal of Epidemiology* 2000;151:878-884.
6. Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *American Journal of Medical Genetics* 1995;59:536-545.
7. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *The New England Journal of Medicine* 1999;341(20):1509-1519.
8. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst Rev*.2001;(3):CD001056.
9. Oakley GP. Inertia on folic acid fortification: public health malpractice. *Teratology* 2002;66:44-54.
10. Wald NJ, Law MR, Morris JK, Wald DS. Quantifying the effect of folic acid. *The Lancet* 2001;358(9298):2069-2073. Erratum in: *Lancet* 359(9306):630, 2002.
11. Botto LD, Olney RS, Erickson JD. Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects. *American Journal of Medical Genetics* 2004;125:12-21.

12. Taruscio D. (Ed.) *Folic Acid: from research to public health practice*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2004. (Rapporti ISTISA 04/26).
13. Oakley GP, Johnston RB: Balancing benefits and harms in public health prevention programmes mandated by governments. *British Medical Journal* 2004;329:41-43.
14. Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *British Medical Journal* 2004;328:211-214.
15. Wald DS, Law M, Morris JK: Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *British Medical Journal* 2002;324:1512-1515.
16. Eichholzer M, Luthy J, Moser U, Fowler B. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. *Swiss Medical Weekly* 2001;131:539-549.
17. French AE, Grant R, Weitzman S, et al. Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2003;74:288-294.
18. Cornel MC, de Smith DJ, de Jong-van den Berg LTW. Folic acid-the scientific debate as a base for public health policy. Review. *Reproductive Toxicology* 2005;20:393-402.
19. *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline: a report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its panel on folate, other B vitamins, and choline and subcommittee on upper reference levels of nutrients*: Washington, DC: National Academy Press; 1998.
20. Czeizel AE, Metneki J, Dudas I. The higher rate of multiple births after periconceptional multivitamin supplementation: an analysis of causes. *Acta geneticae medicae et gemellologiae* (Roma) 1994;43:175-184.
21. Werler MM, Cragan JD, Wasserman CR, Shaw GM, Erickson JD, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and multiple births. *American Journal of Medical Genetics* 1997;71:93-96.
22. Ericson A, Kallen B, Aberg A. Use of multivitamins and folic acid in early pregnancy and multiple births in Sweden. *Twin Research* 2001;4:63-66.
23. Kallen B. Use of folic acid supplementation and risk for dizygotic twinning. *Early Human Development* 2004;80:143-151.
24. Czeizel AE, Vargha P. Periconceptional folic acid/multivitamin supplementation and twin pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004;191:790-794.
25. Haggarty P, McCallum H, McBain H, et al. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *The Lancet* 2006;367(9521):1513-1519.
26. Hook EB, Czeizel AE. Can terathanasia explain the protective effect of folic-acid supplementation on birth defects? *The Lancet* 1997;350:513-515.
27. Windham GC, Shaw GM, Todoroff K, Swan SH. Miscarriage and use of multi-vitamins or folic acid. *American Journal of Medical Genetics* 2000;90(3):261-262.
28. Kim YI. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *American Journal of Clinical Nutrition* 2004;80:1123-1128.
29. Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R. Folic acid: a public/health challenge. Review. *The Lancet* 2006;367:1352-3561.
30. de Jong-Van den Berg LT, Hernandez-Diaz S, Werler MM, Louik C, Mitchell AA. Trends and predictors of folic acid awareness and periconceptional use in pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005;192:121-128.
31. Bianchi F, Botto L, Caramelli L, Carmignani A, Di Tanna G.L, Dukic T, Garcia Bonillo S.C, Mastroiacovo P, Pierini A, Scarinci R, Sorace M, Strigini F, Watkins M.: Folic acid in Tuscany, Italy: what do women know, think, and do? Atti del 30th Annual Meeting of the International

- Clearinghouse for Birth Defects Monitoring System. Clermont-Ferrand (France), September 18-21, 2003.
32. Lucock M, Yates Z. Folic acid-vitamin and panacea or genetic time bomb? *Nature Reviews. Genetics* 2005;6:235-240.
 33. Network Italiano Promozione Acido Folico per la Prevenzione Primaria di Difetti Congeniti, Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità. <http://www.cnmr.iss.it/>.

APPENDICE A

Andamento delle prevalenze annuali delle MC

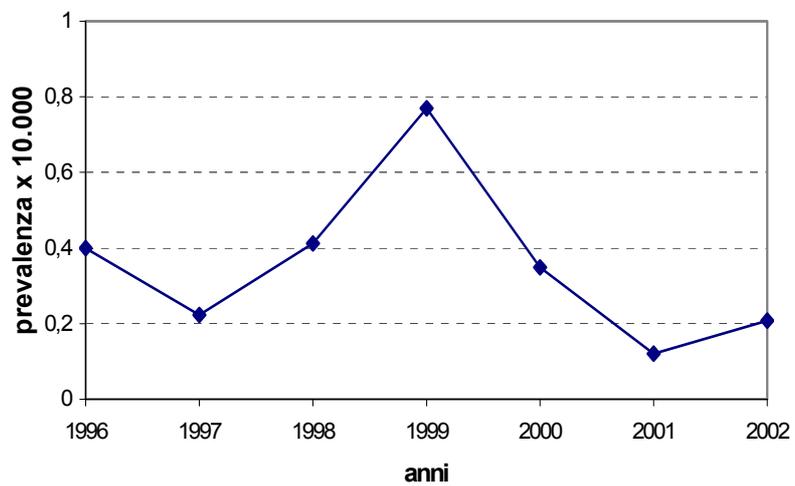


Figura A1a. Anencefalia: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

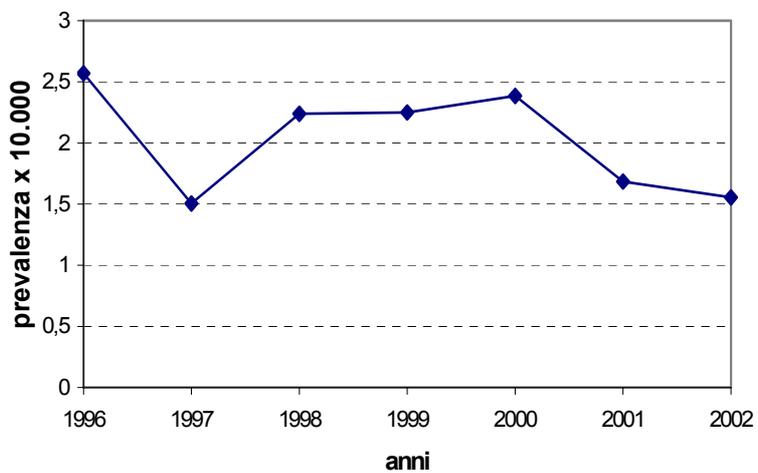


Figura A1b. Anencefalia: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

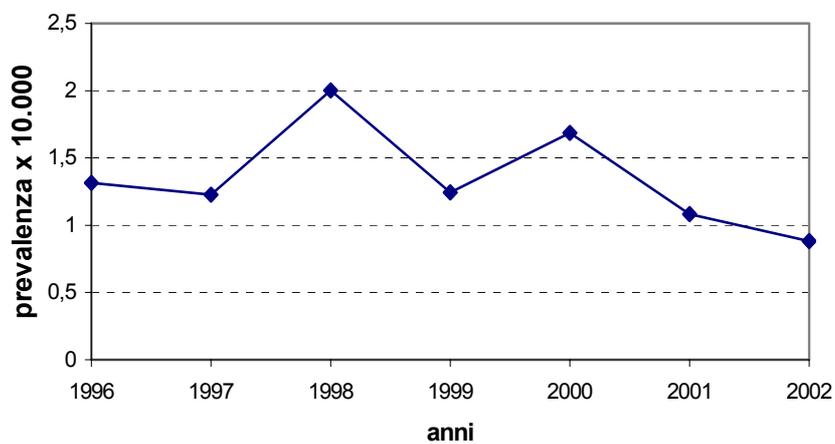


Figura A2a. Spina bifida: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

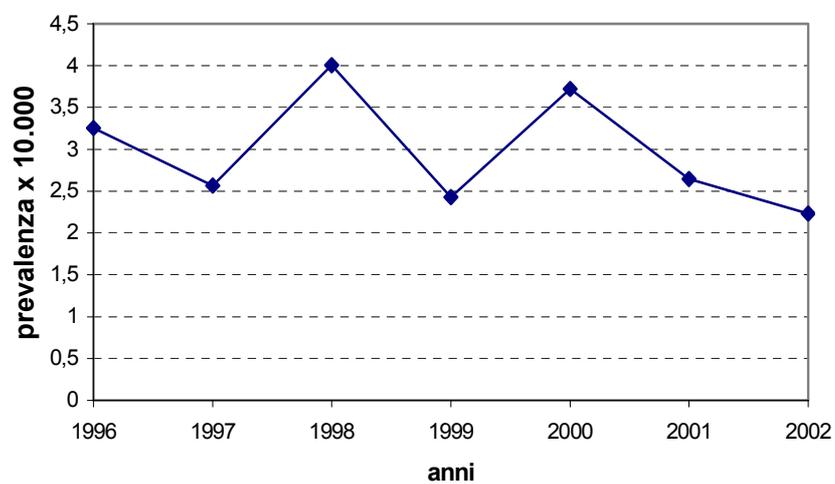


Figura A2b. Spina bifida: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

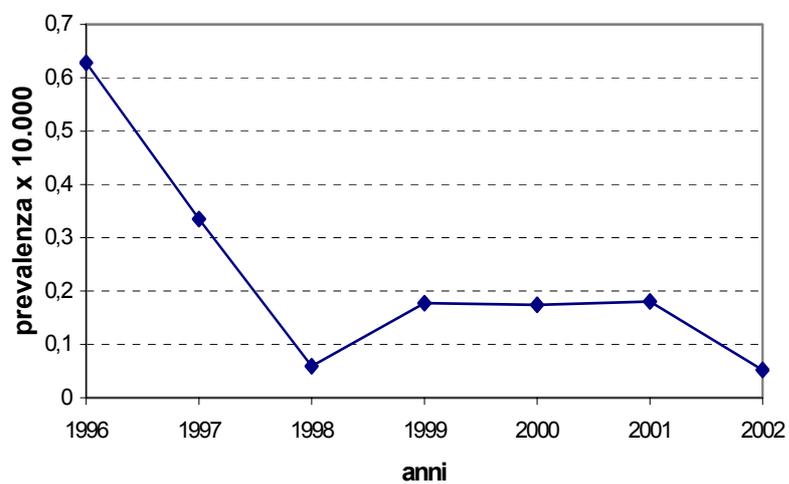


Figura A3a. Encefalocele: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

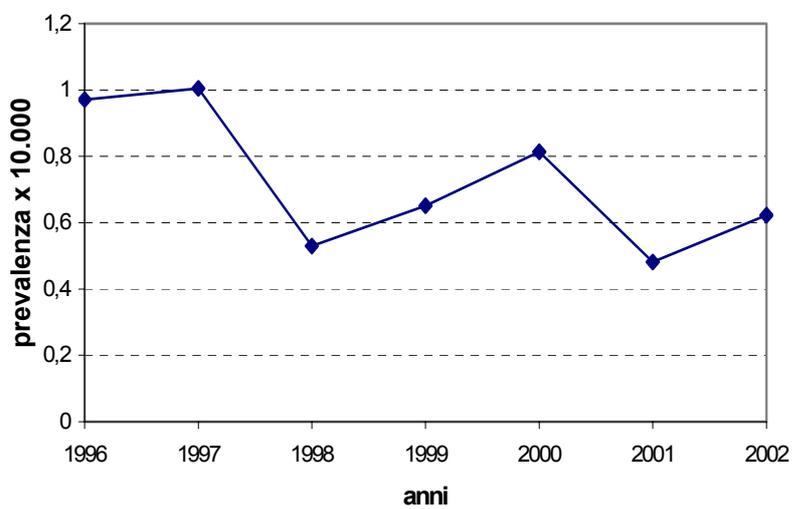


Figura A3b. Encefalocele: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

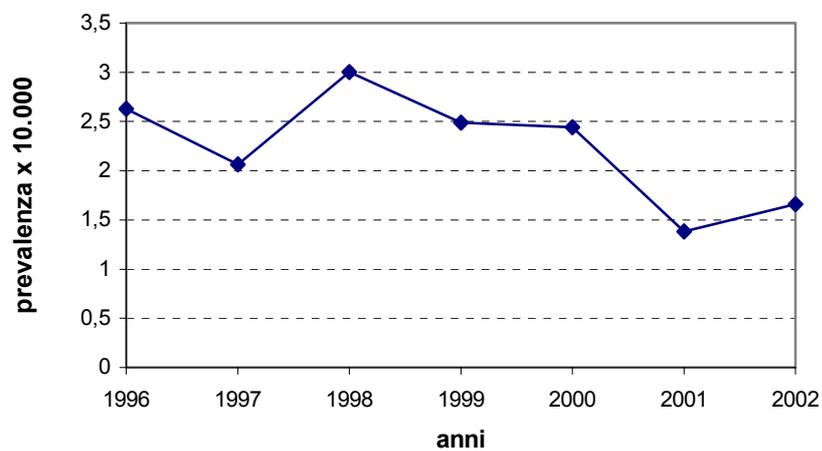


Figura A4a. Difetti tubo neurale: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

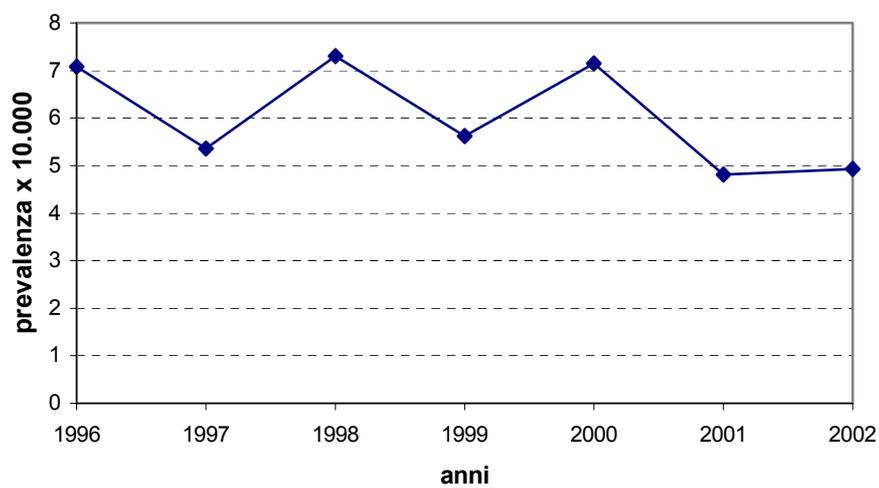


Figura A4b. Difetti tubo neurale: andamento prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

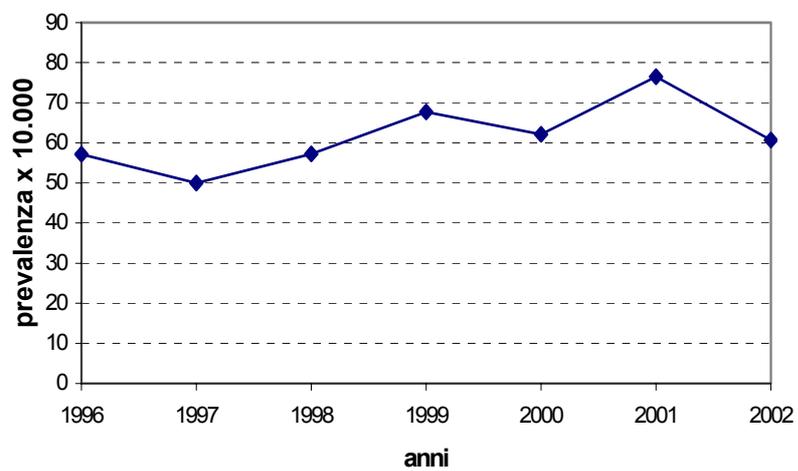


Figura A5a. Cardiovascolare: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

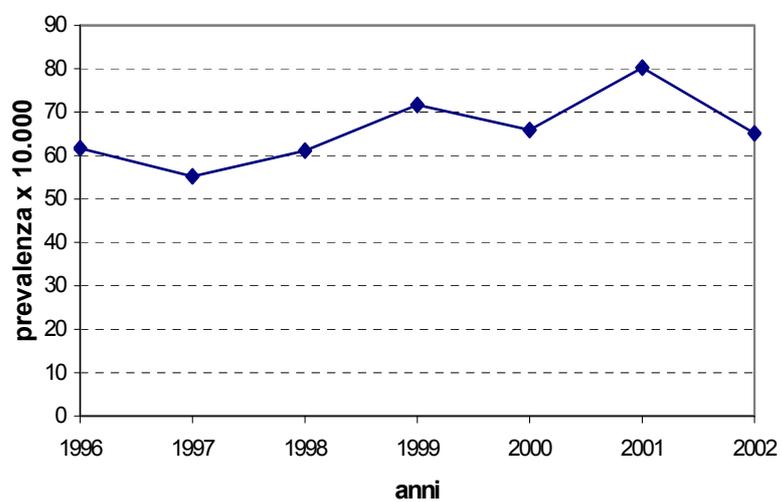


Figura A5b. Cardiovascolare: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

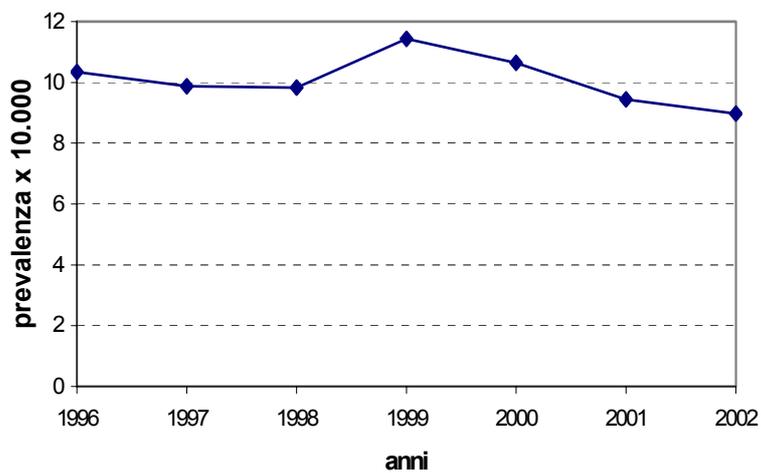


Figura A6a. Schisi orali: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

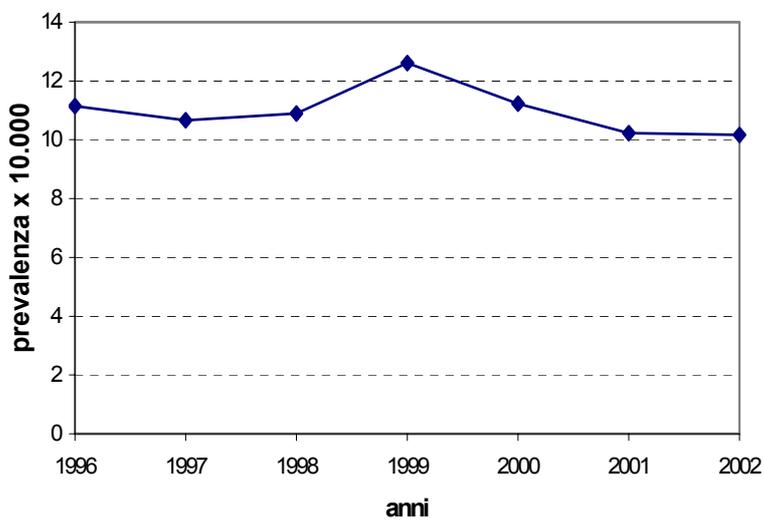


Figura A6b. Schisi orali: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

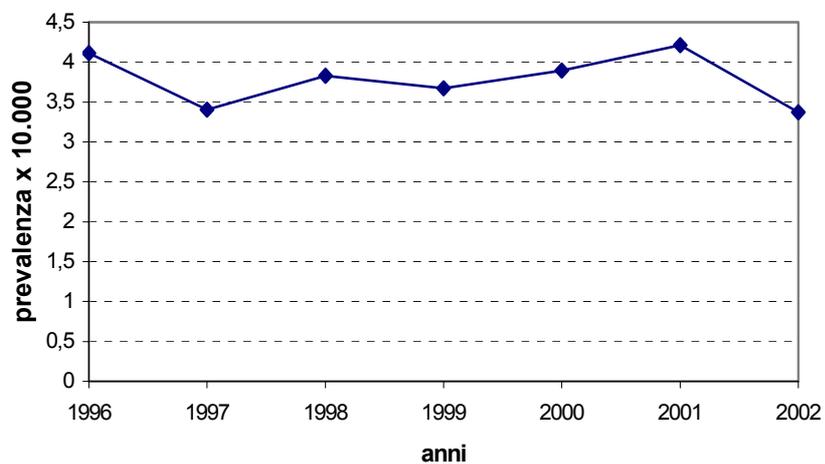


Figura A7a. Riduzione arti: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

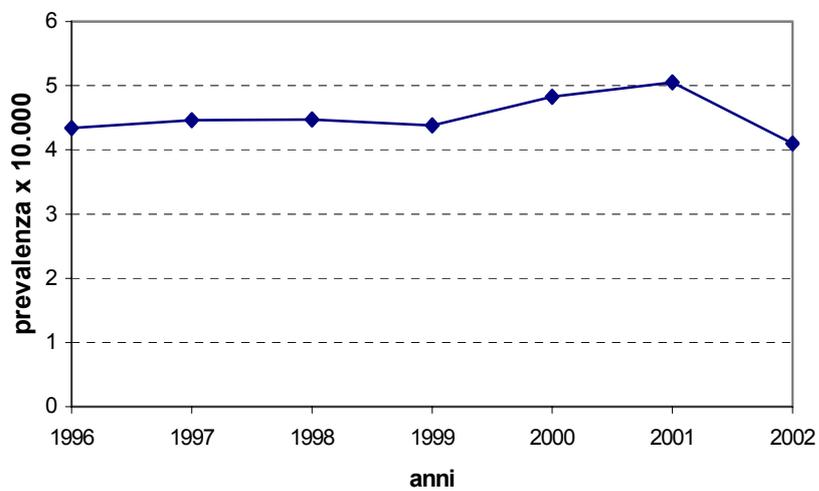


Figura A7b. Riduzione arti: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

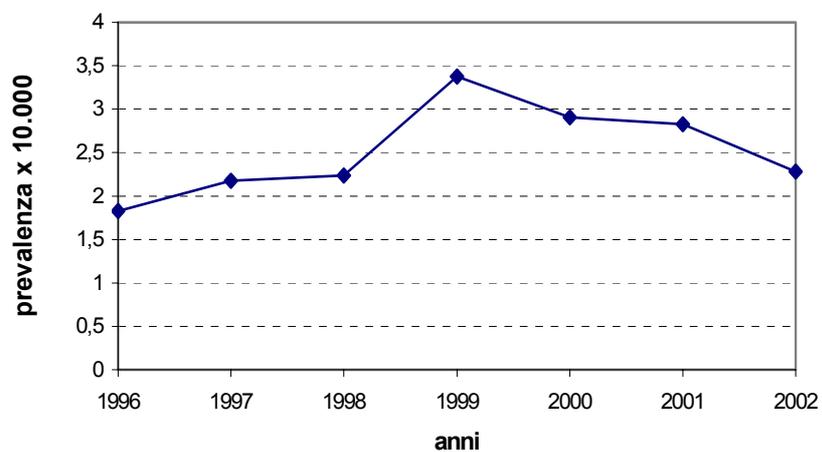


Figura A8a. Atr./st. anorettale: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

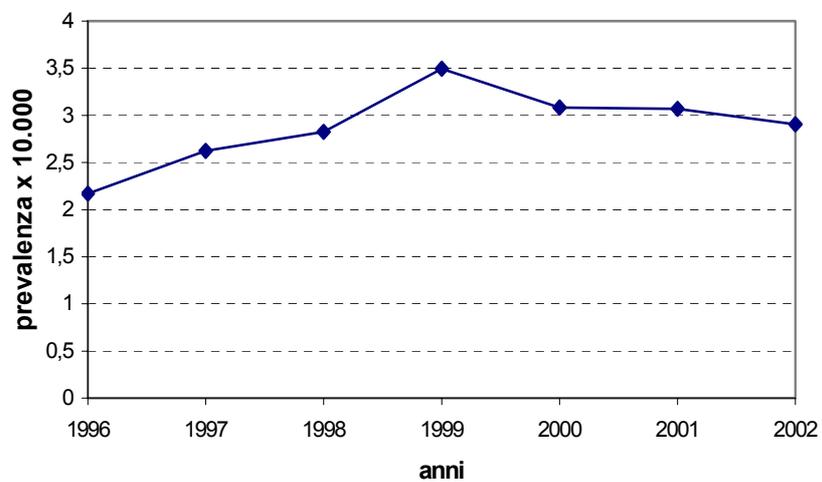


Figura A8b. Atr./st. anorettale: andamento prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

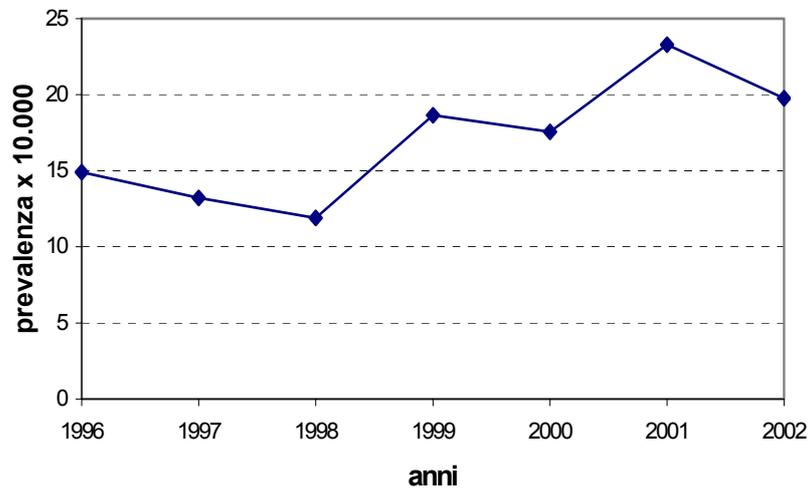


Figura A9a. Urinario: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

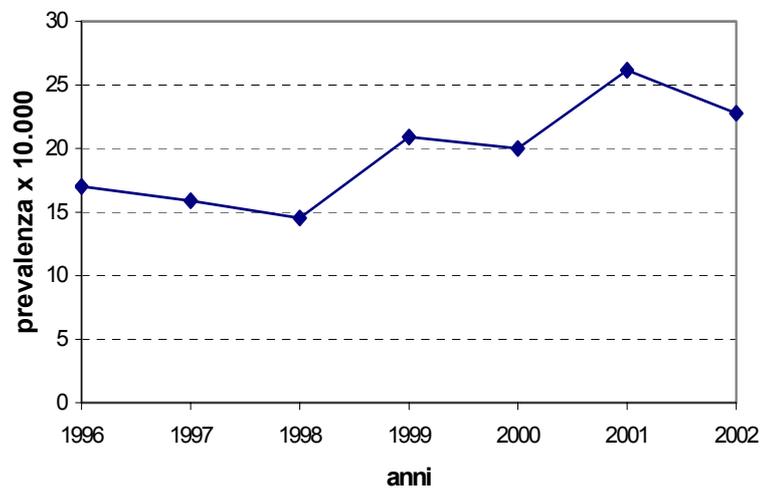


Figura A9b. Urinario: andamento prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

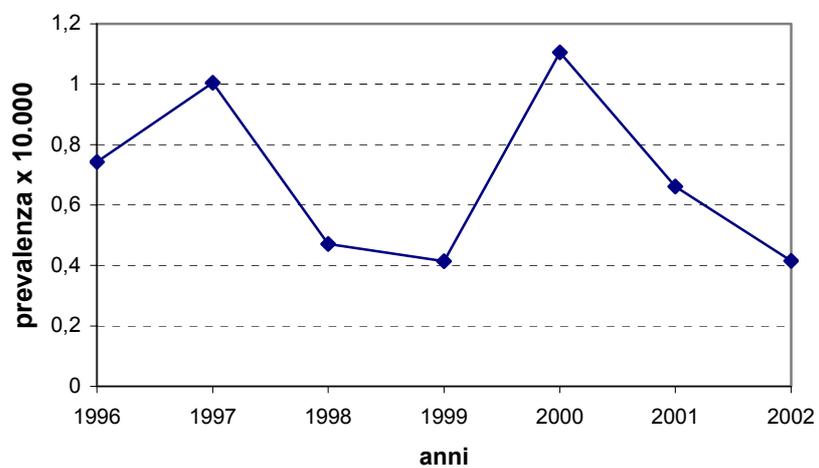


Figura A10a. Onfalocele: andamento della prevalenza annuale sul totale dei nati

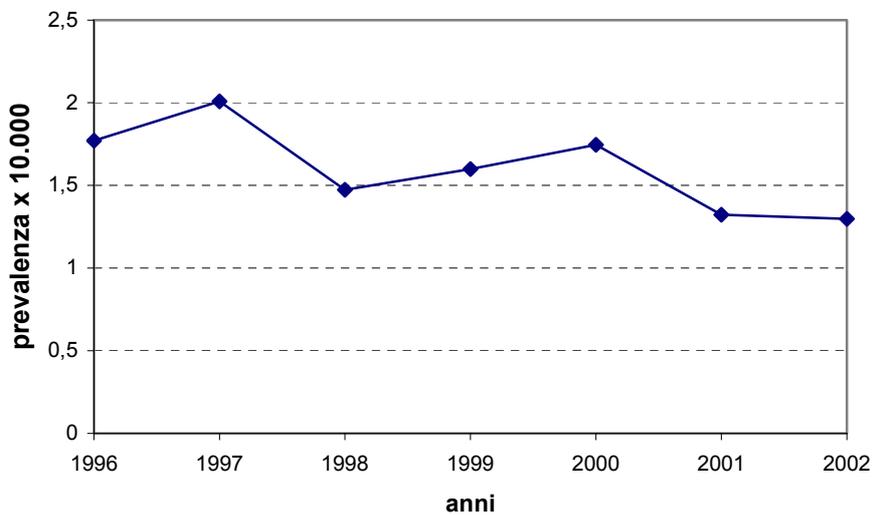


Figura A10b. Onfalocele: andamento prevalenza annuale sul totale dei nati+IVG

APPENDICE B

**Distribuzione delle MC per tipo di manifestazione
(isolata, multipla, cromosomica, condizione nota)
per ciascun Registro**

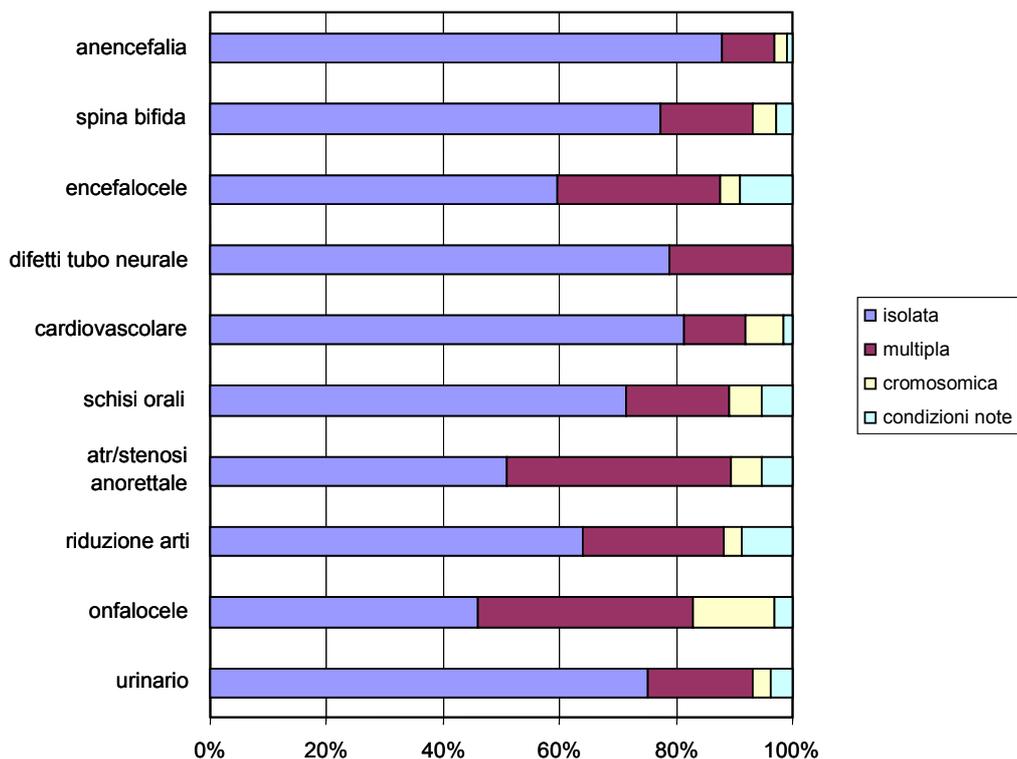


Figura B1. Totale RDC: distribuzione delle MC in I/M/C/CN (nati + IVG)

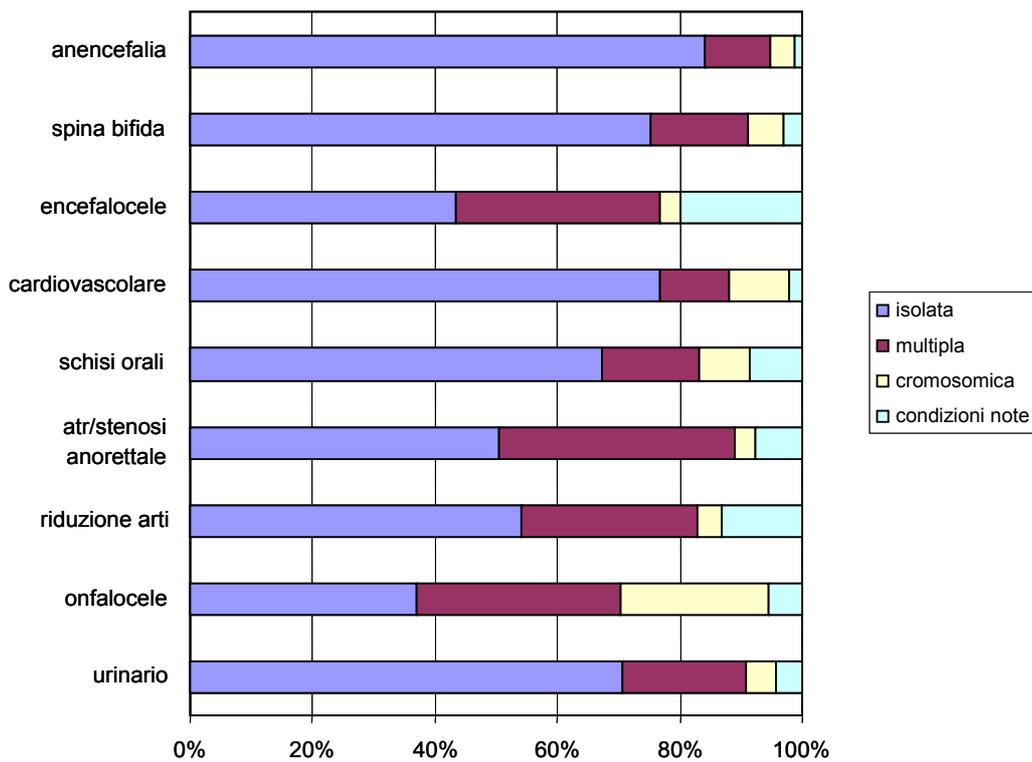


Figura B2. NEI: distribuzione delle MC in I/M/C/CN (nati + IVG)

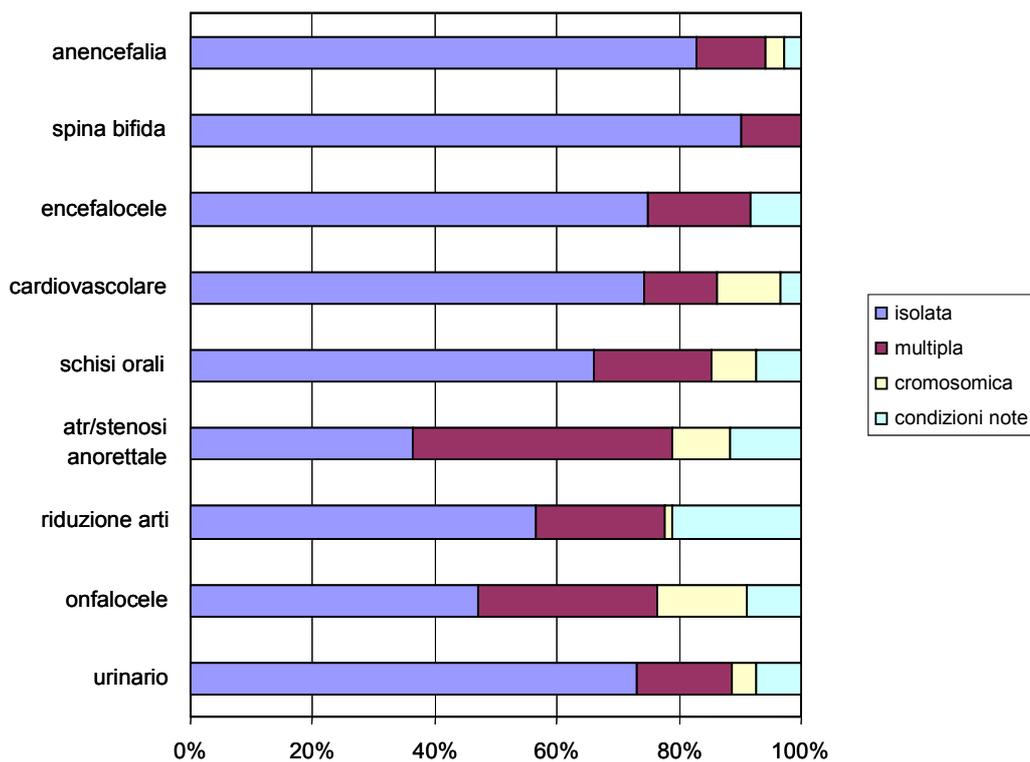


Figura B3. IMER: distribuzione delle MC in I/M/C/CN (nati + IVG)

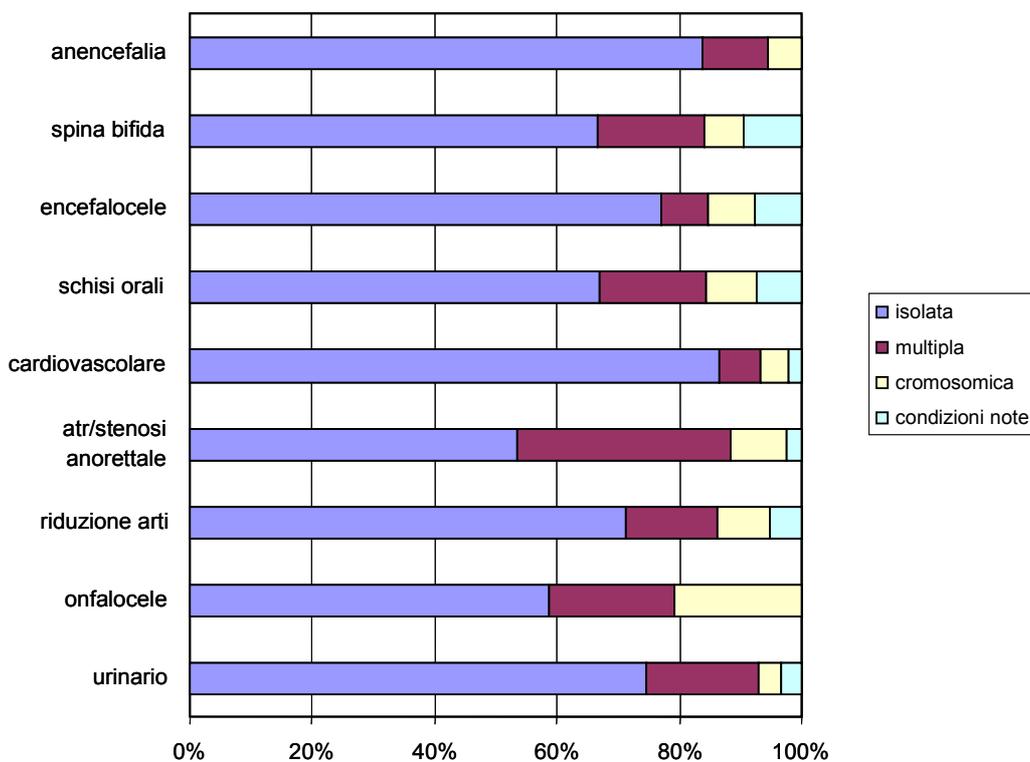


Figura B4. RTDC: distribuzione delle MC in I/M/C/CN (nati + IVG)

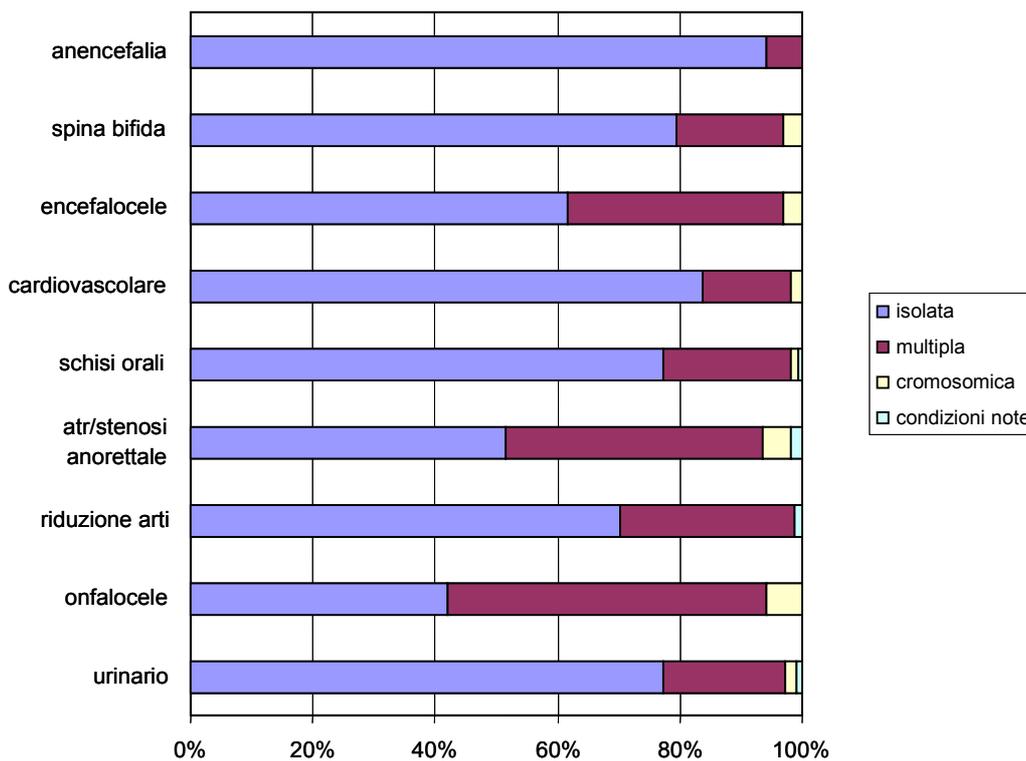


Figura B5. RCD: distribuzione delle MC in I/M/C/CN (nati + IVG)

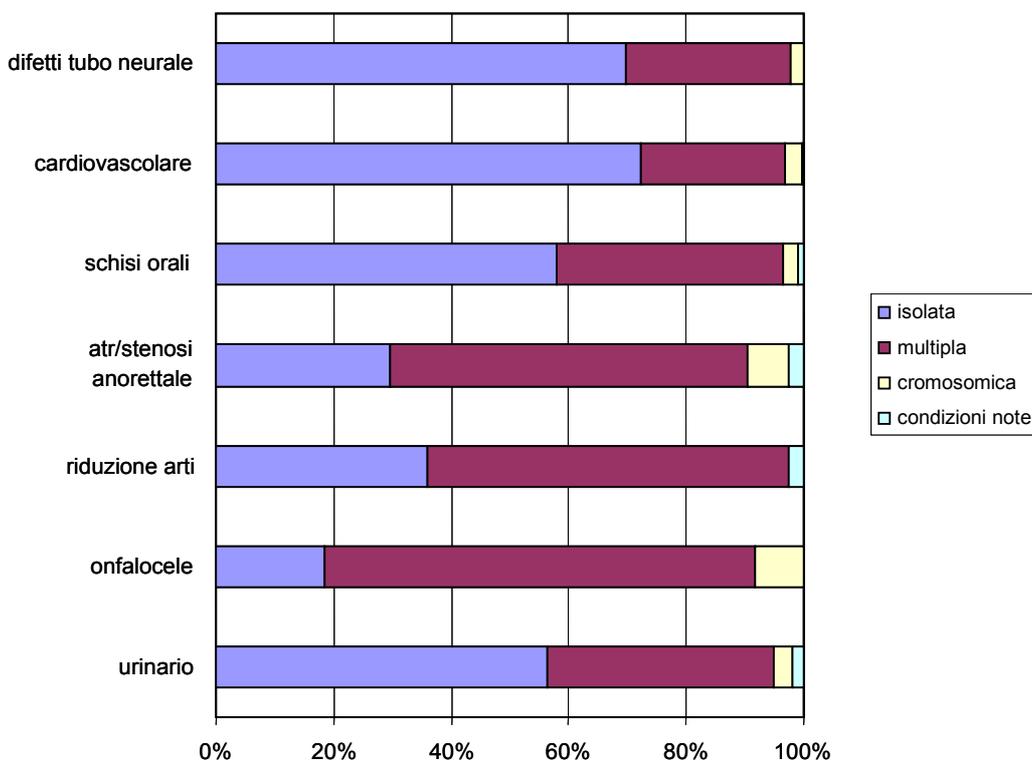


Figura B6. ISMAC: distribuzione delle MC in I/M/C/CN (nati)

APPENDICE C

Prevalenze totali e alla nascita delle MC

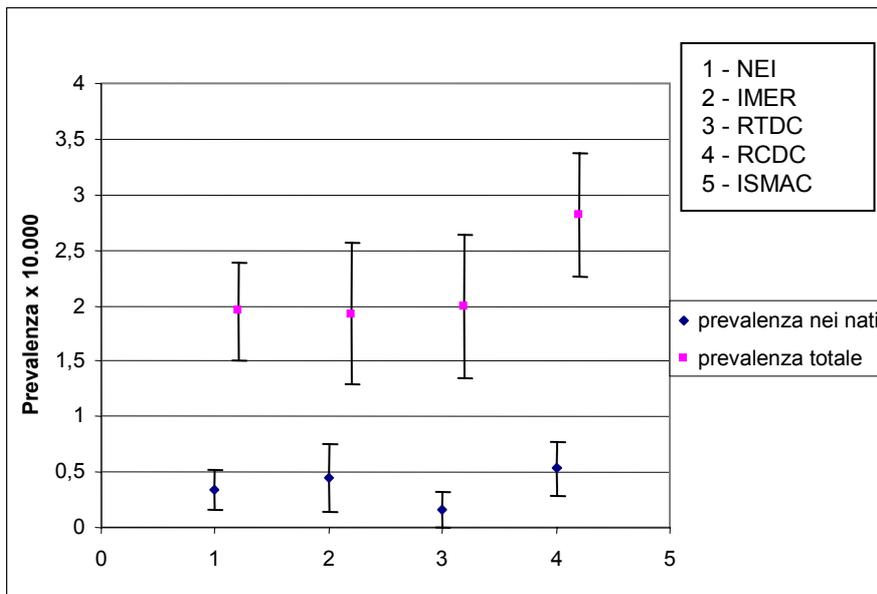


Figura C1. Anencefalia: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

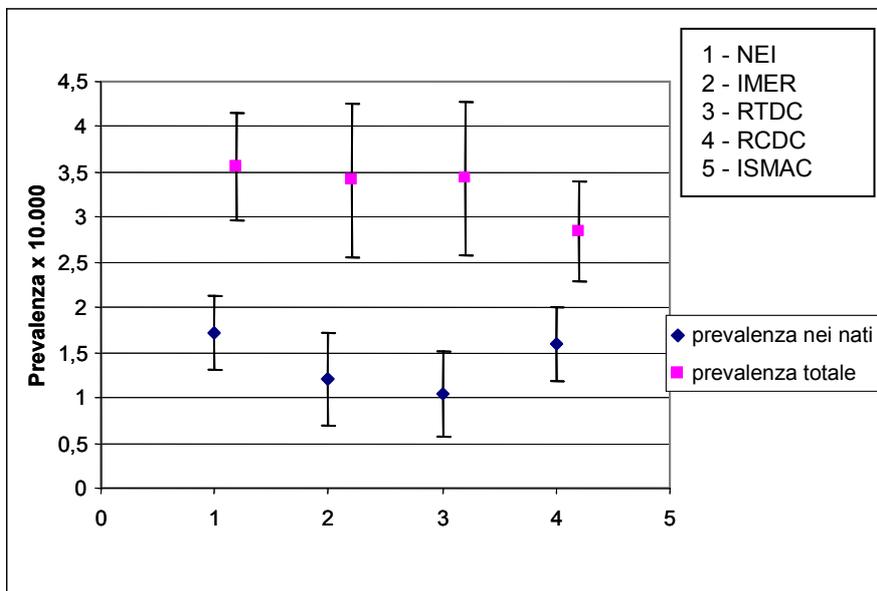


Figura C2. Spina bifida: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

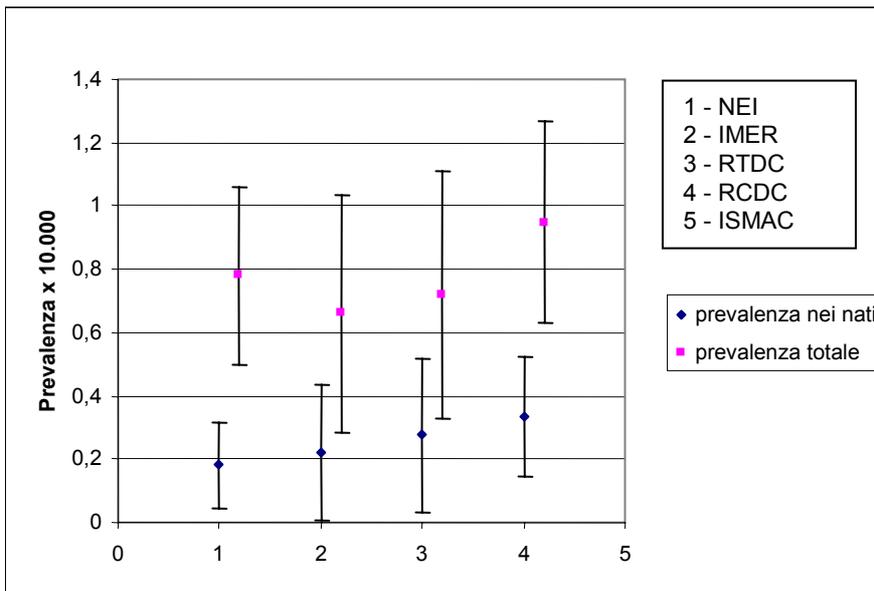


Figura C3. Encefalocele: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

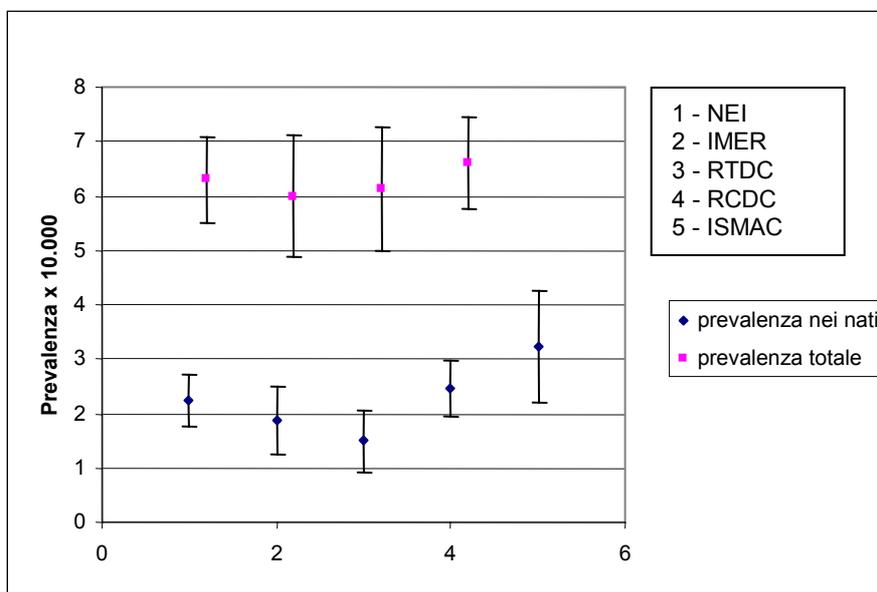


Figura C4. Difetti tubo neurale: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

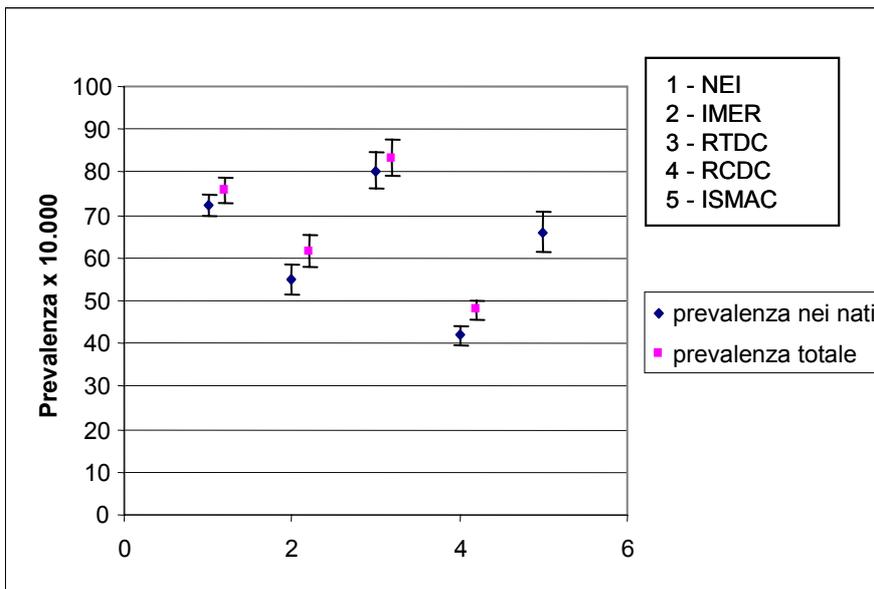


Figura C5. Cardiovascolari: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

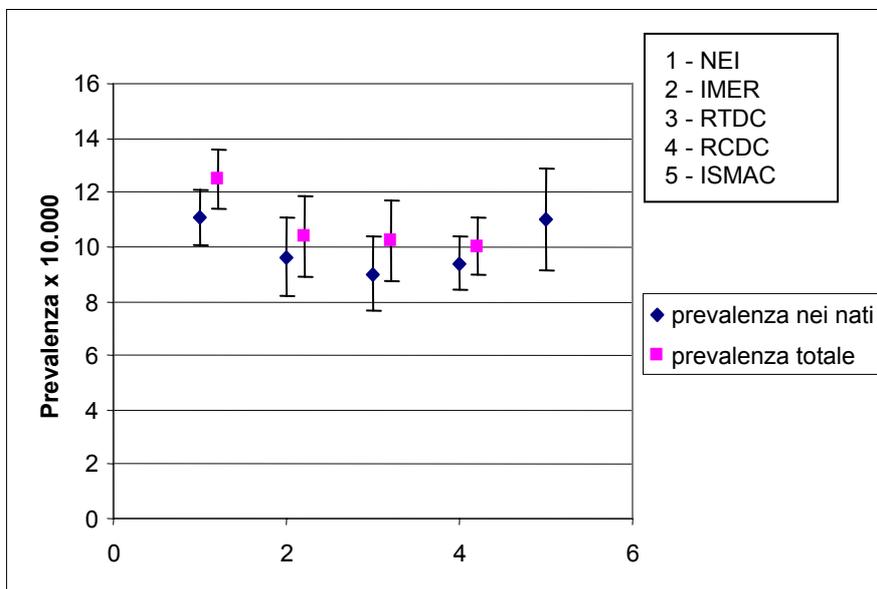


Figura C6. Schisi orali: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

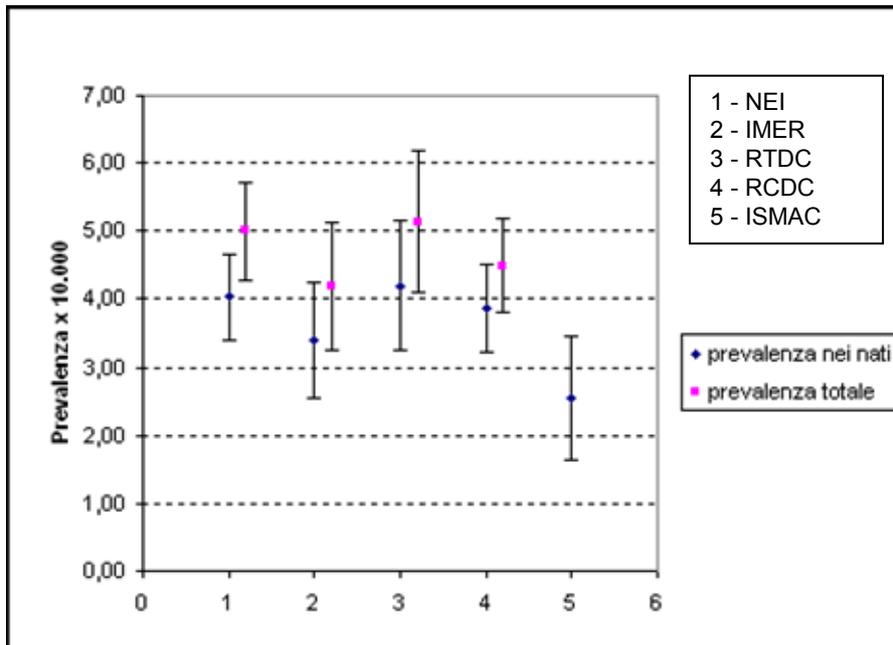


Figura C7. Riduzione arti: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro.

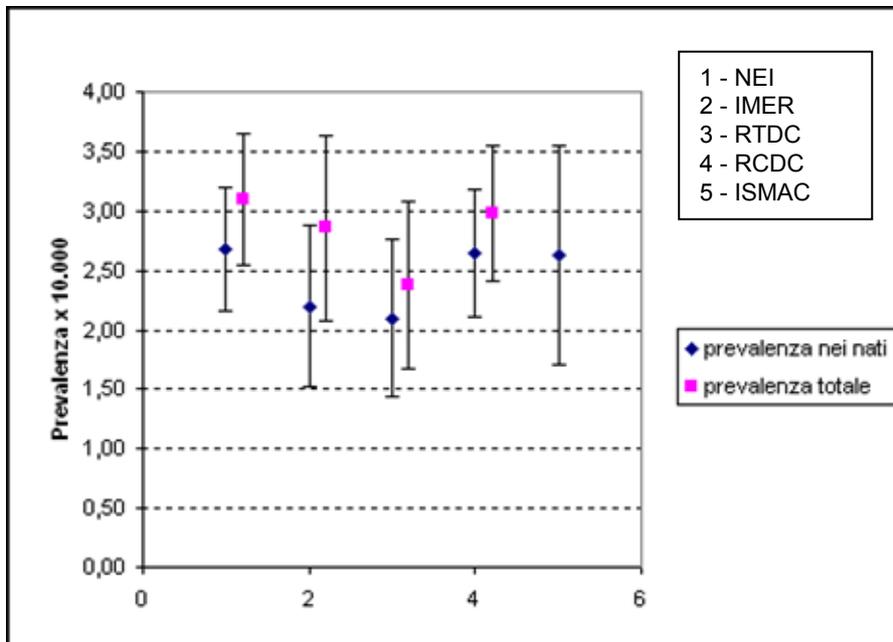


Figura C8. Atr./stenosi anorettale: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

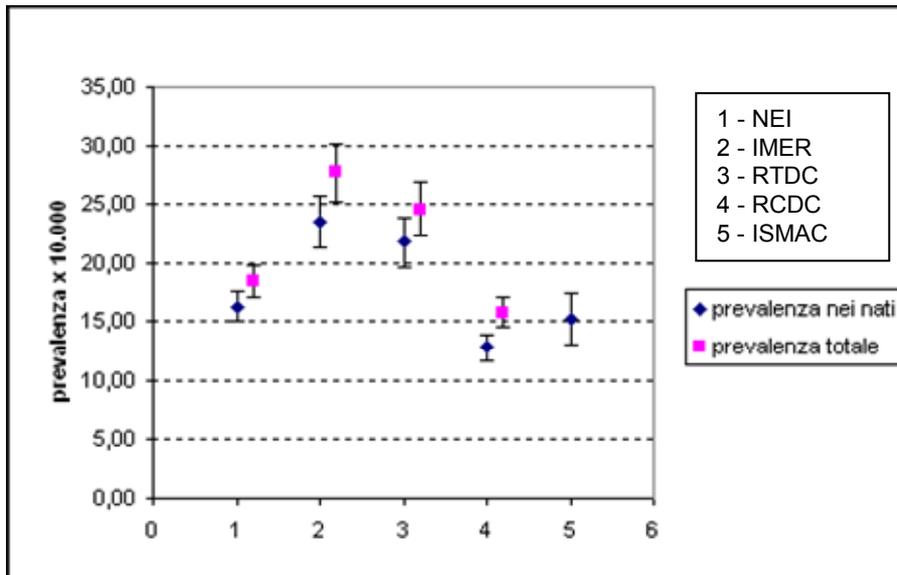


Figura C9. Urinario: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

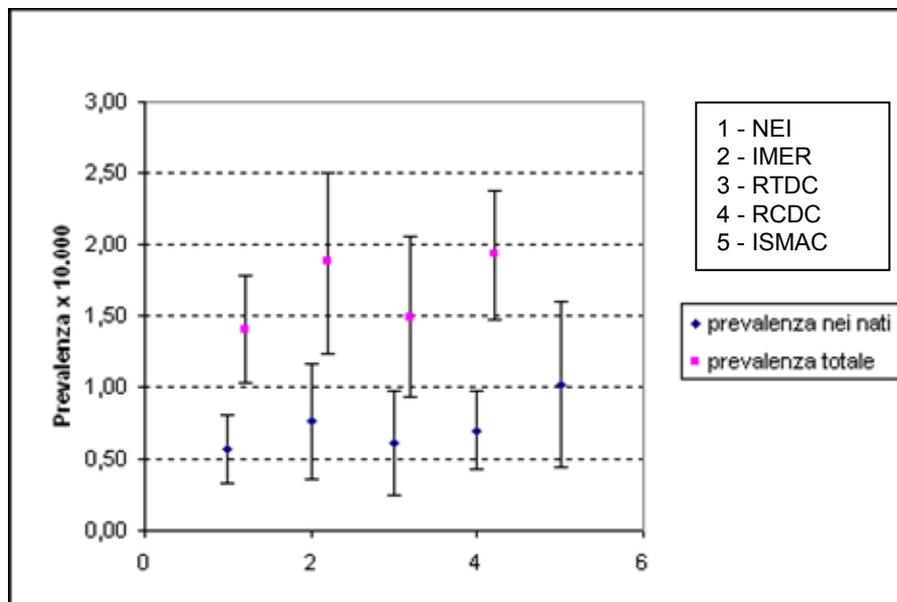


Figura C10. Onfalocele: Prevalenza e intervalli di confidenza, per Registro

APPENDICE D

**Andamento temporale, test di omogeneità,
trend e linearità delle prevalenze delle MC
selezionate negli RDC**

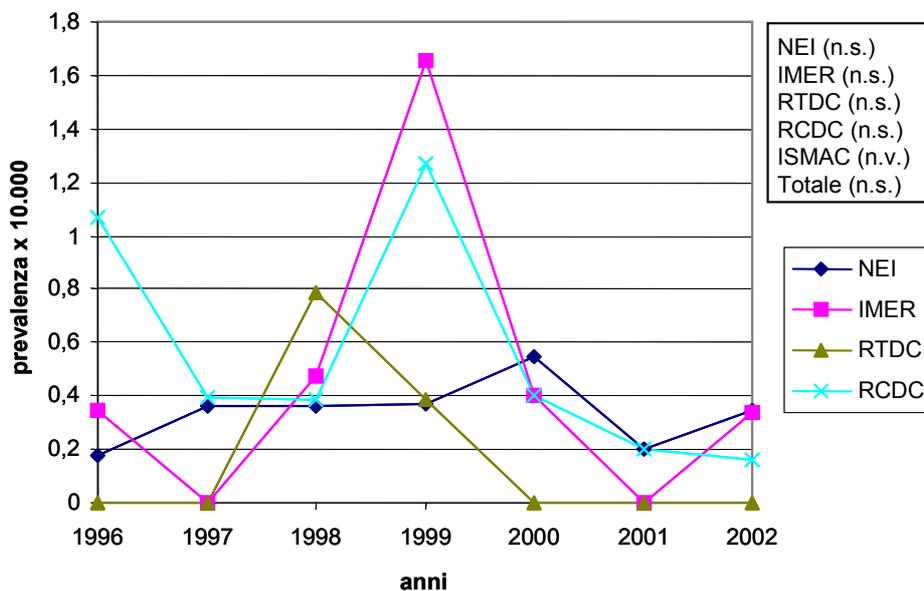


Figura D1a. Anencefalia: andamento temporale nei nati

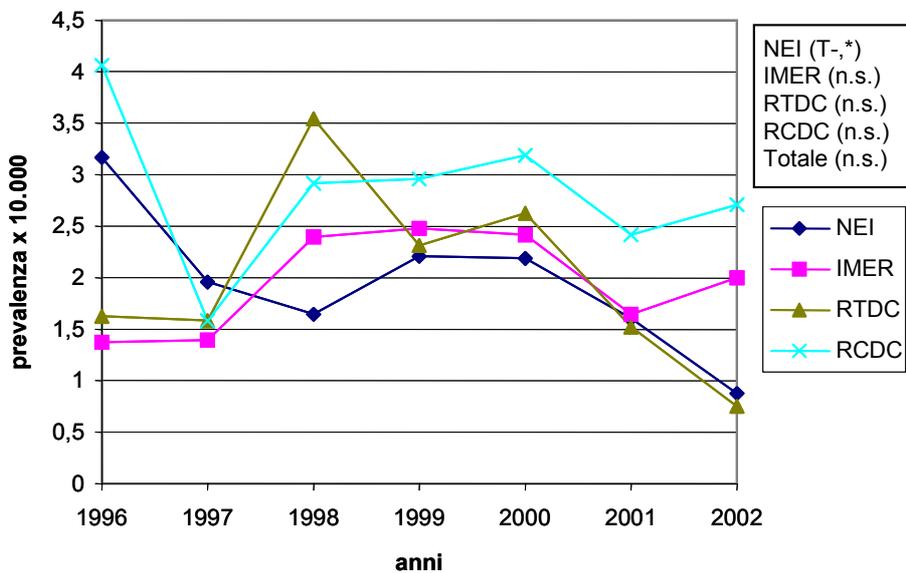


Figura D1b. Anencefalia: andamento temporale nei nati + IVG

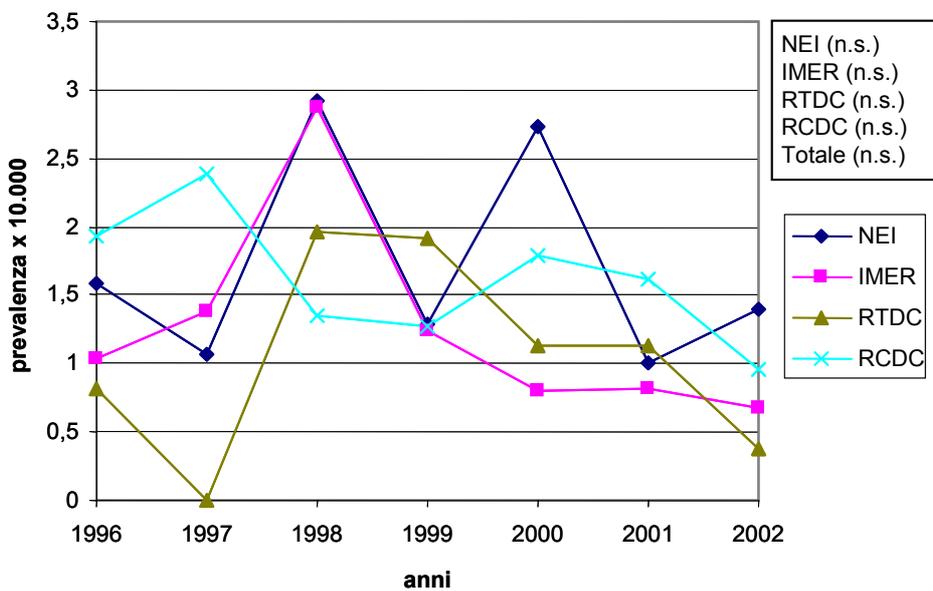


Figura D2a. Spina bifida: andamento temporale nei nati

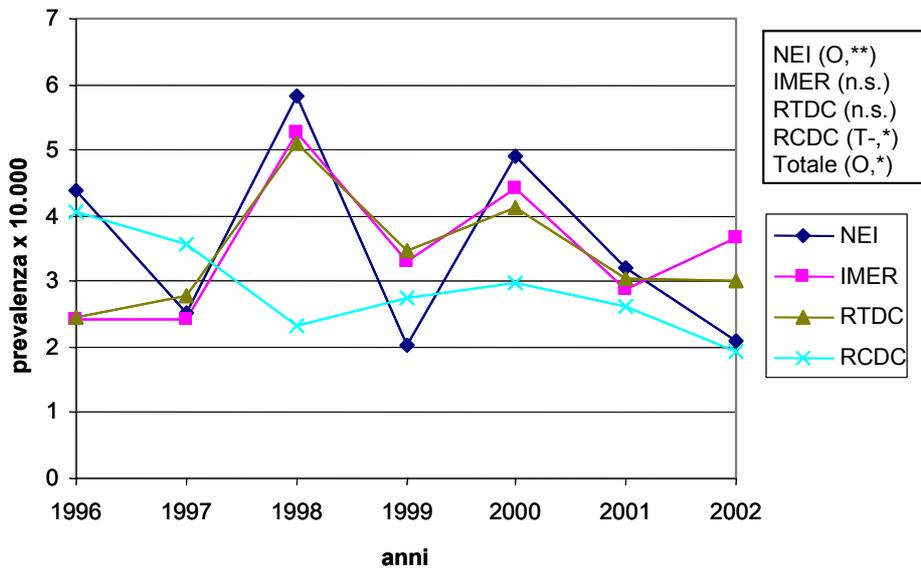


Figura D2b. Spina bifida: andamento temporale nei nati + IVG

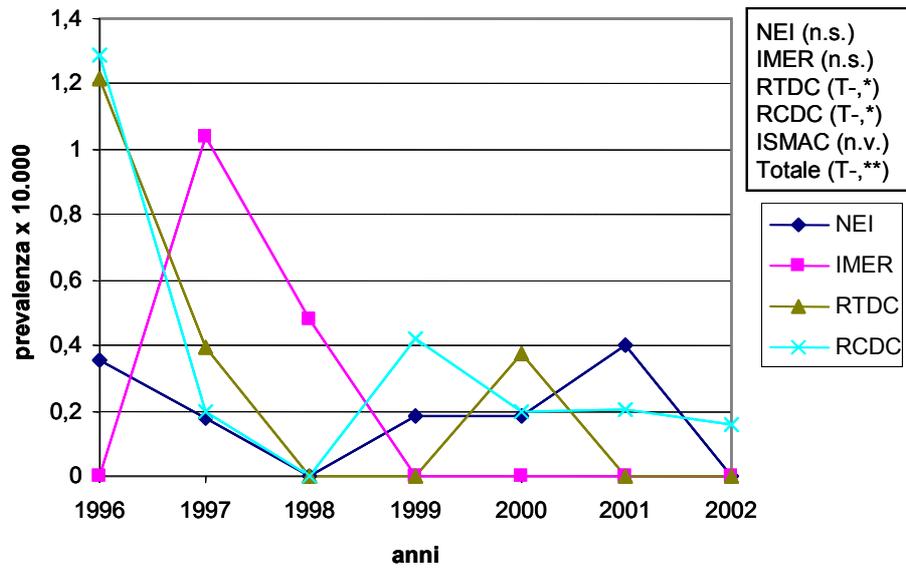


Figura D3a. Encefalocele: andamento temporale nei nati

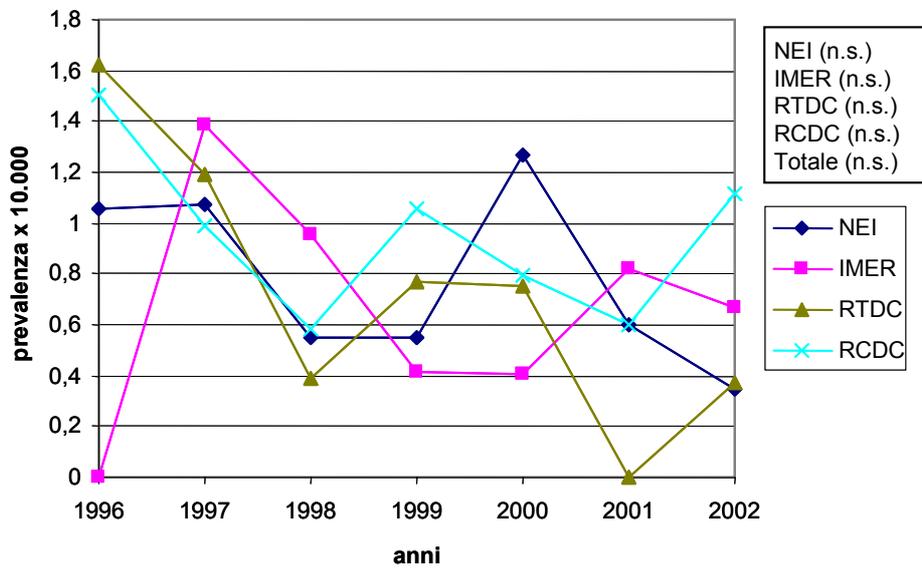


Figura D3b. Encefalocele: andamento temporale nei nati + IVG

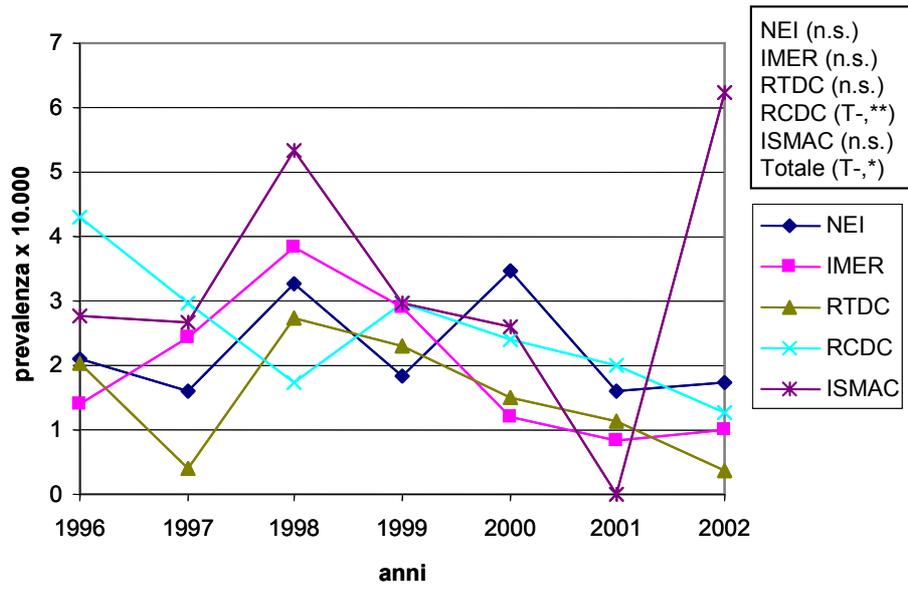


Figura D4a. Difetti tubo neurale: andamento temporale nei nati

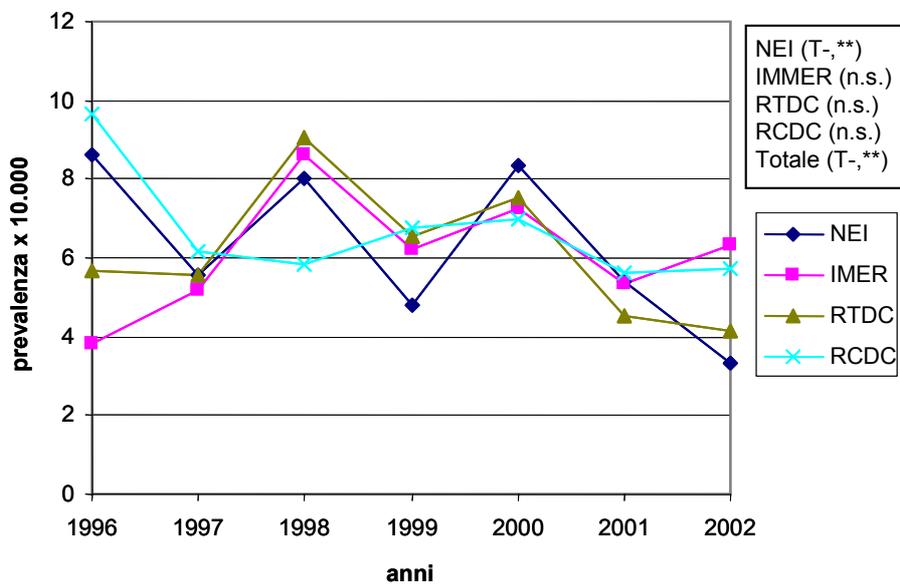


Figura D4b. Difetti tubo neurale: andamento temporale nei nati + IVG

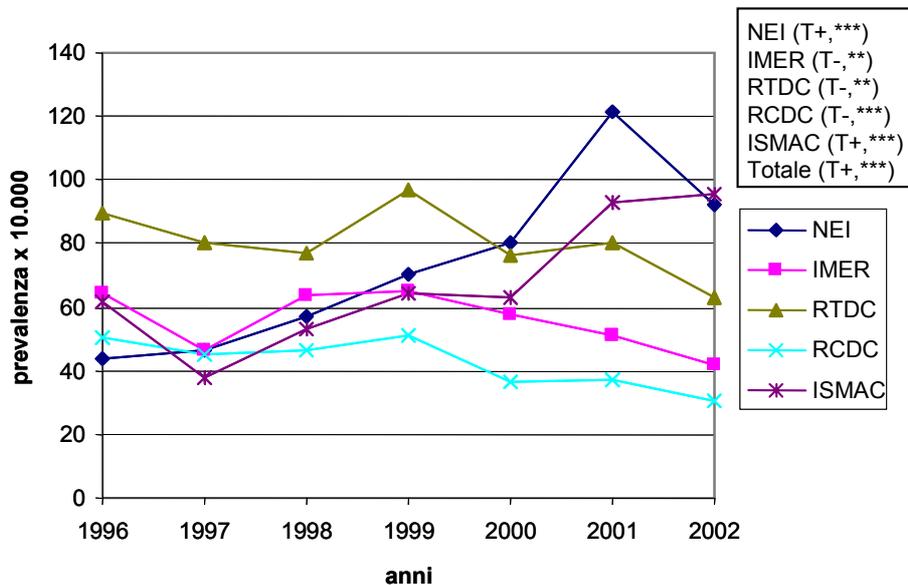


Figura D5a. Cardiovascolare: andamento temporale nei nati.

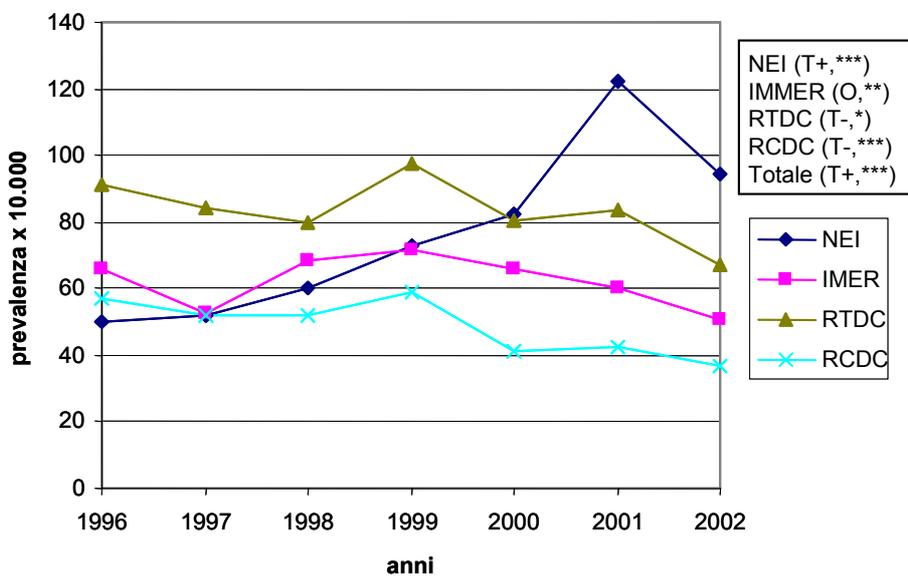


Figura D5b. Cardiovascolare: andamento temporale nei nati + IVG

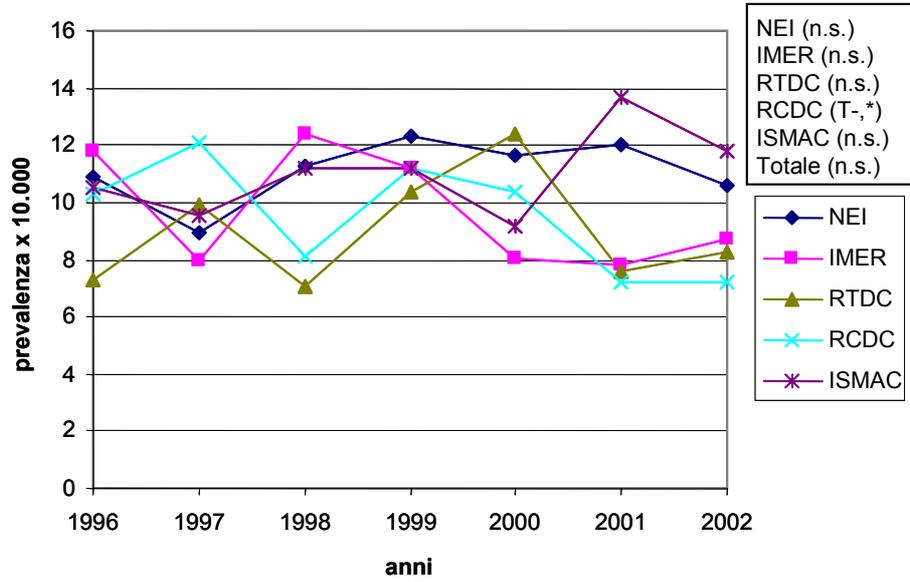


Figura D6a. Schisi orali: andamento temporale nei nati

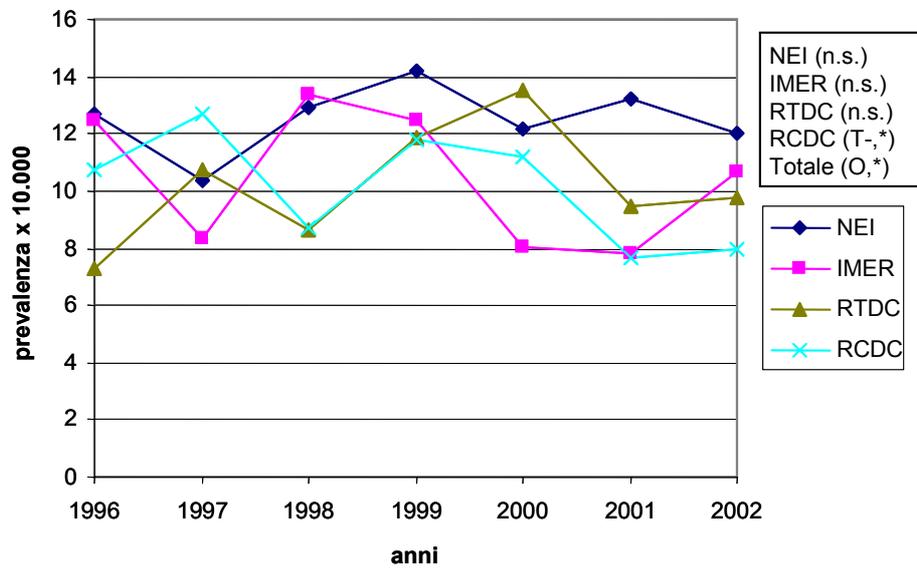


Figura D6b. Schisi orali: andamento temporale nei nati + IVG

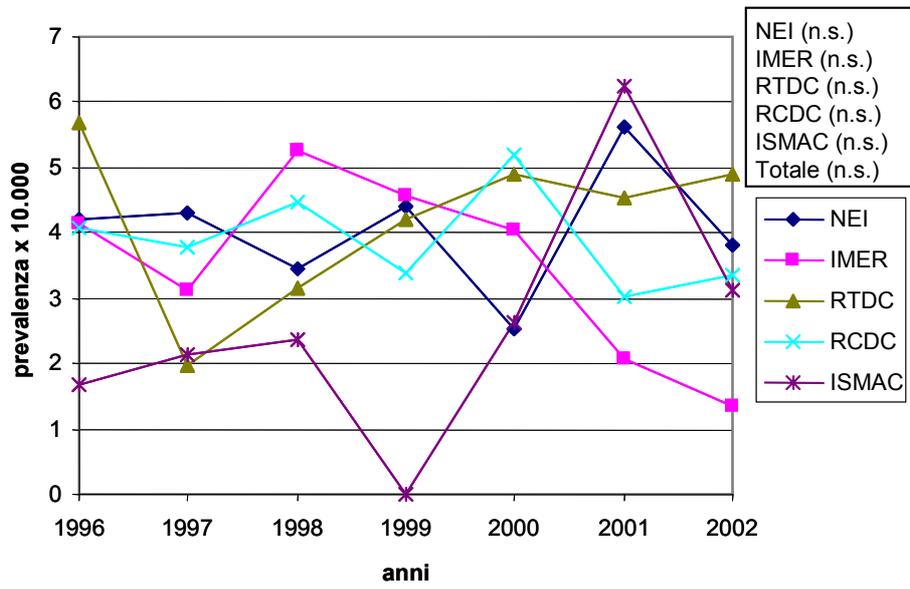


Figura D7a. Riduzione arti: andamento temporale nei nati

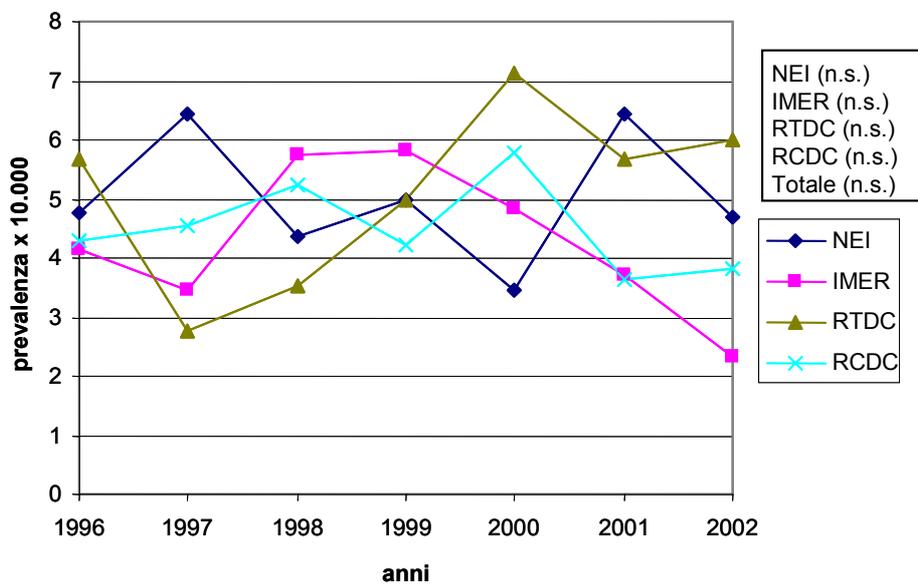


Figura D7b. Riduzione arti: andamento temporale nei nati + IVG

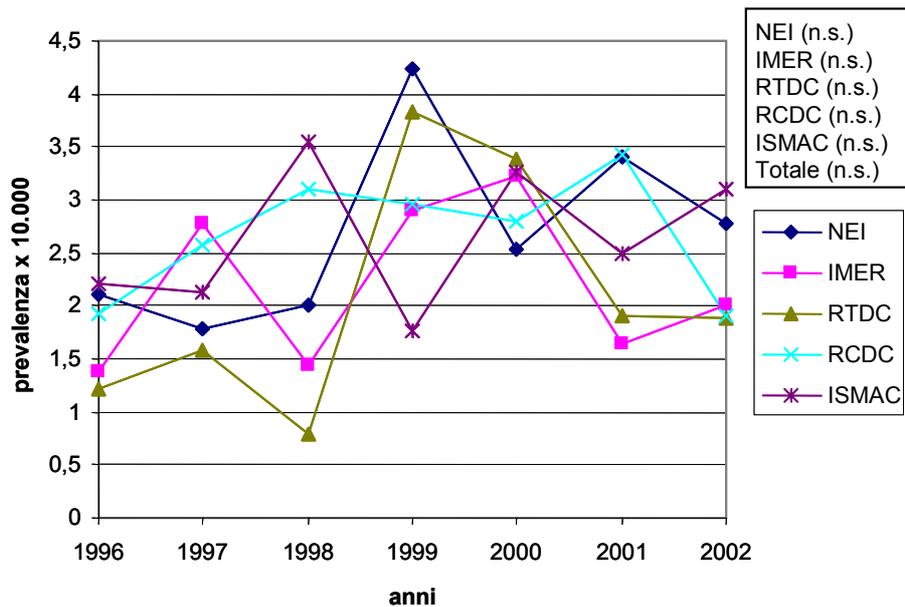


Figura D8a. Atresia/stenosi anorettale: andamento temporale nei nati

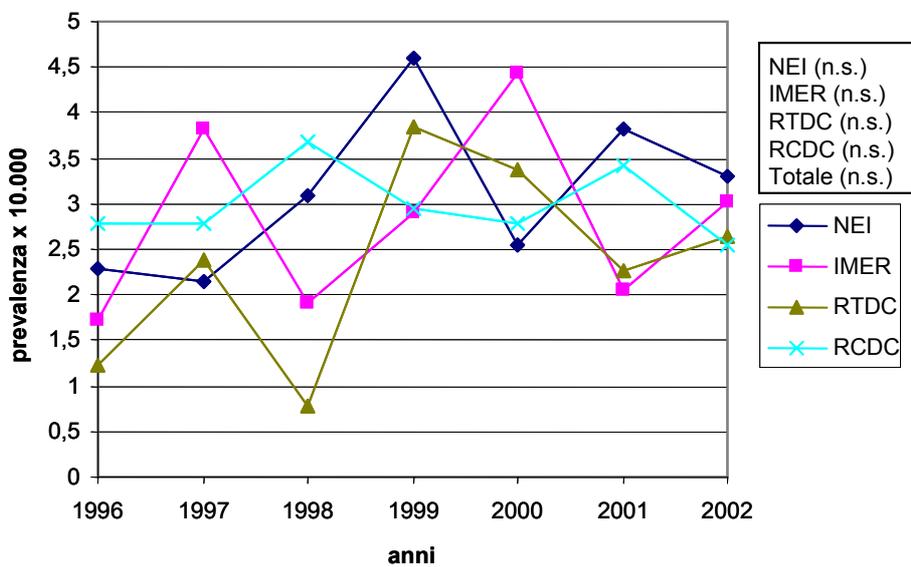


Figura D8b. Atresia/stenosi anorettale: andamento temporale nei nati + IVG

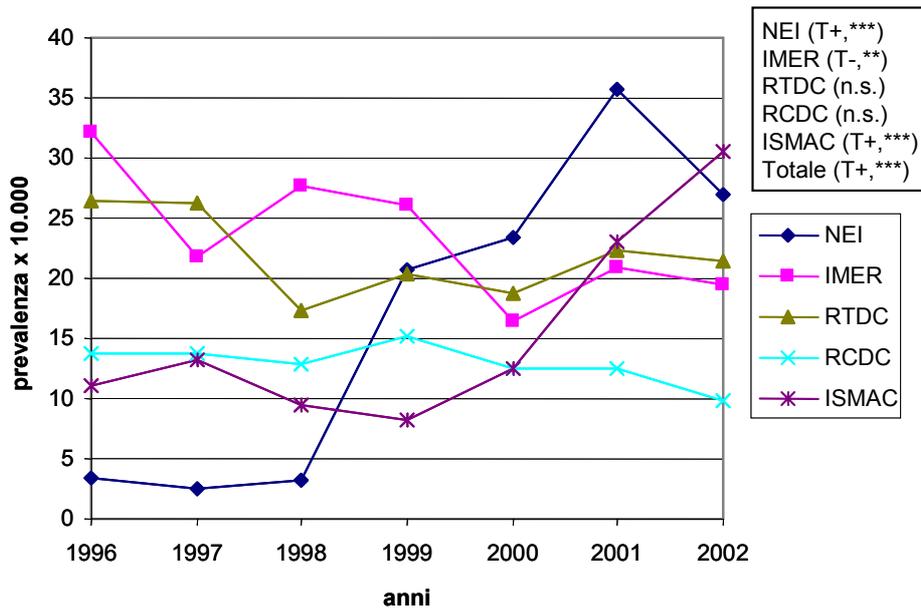


Figura D9a. Urinario: andamento temporale nei nati

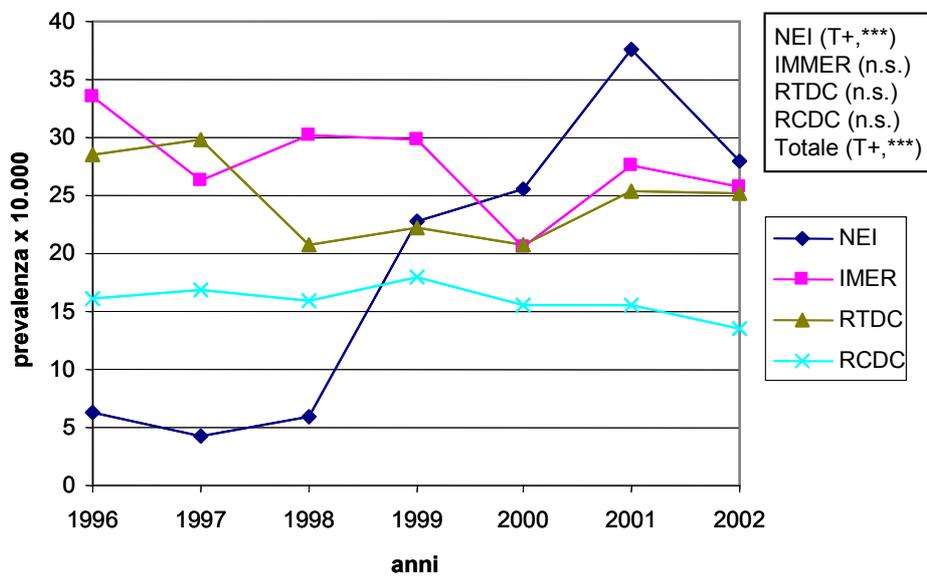


Figura D9b. Urinario: andamento temporale nei nati + IVG

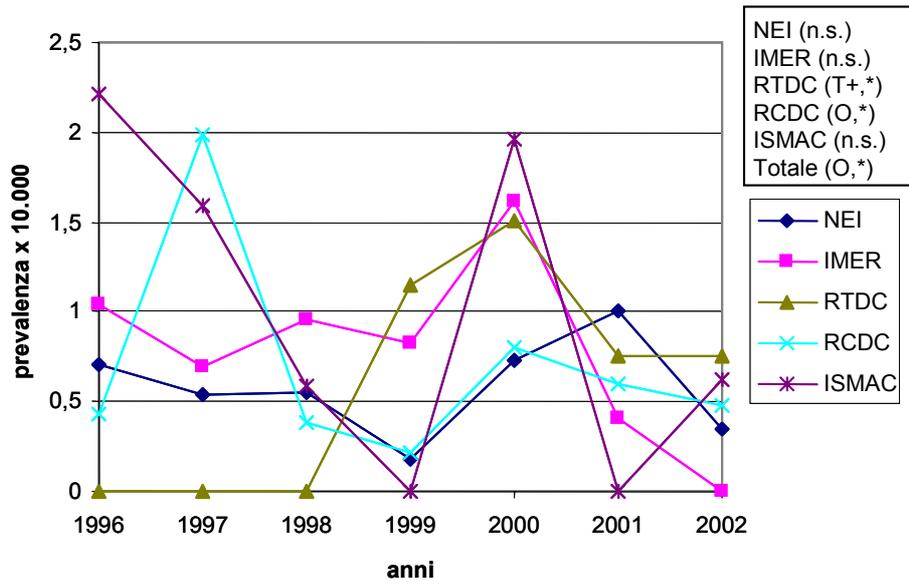


Figura D10a. Omphalocele: andamento temporale nei nati

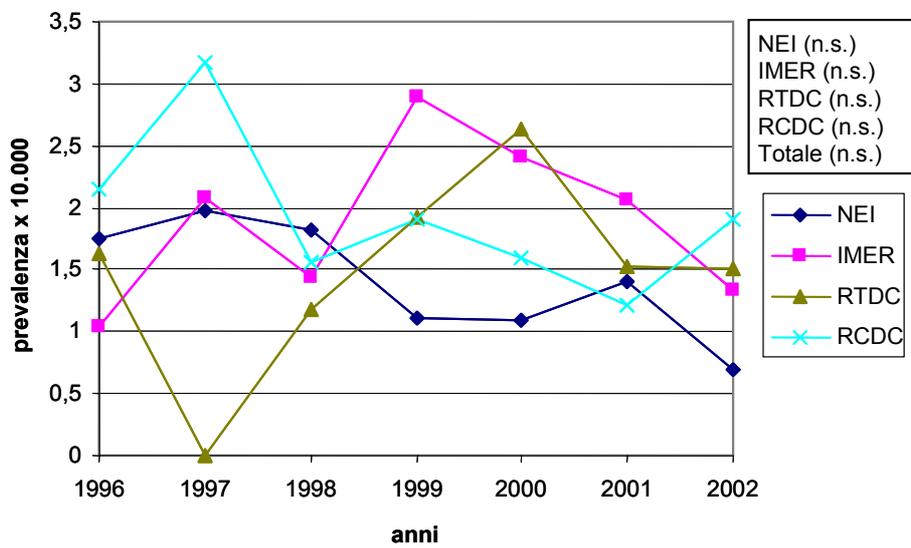


Figura D10b. Omphalocele: andamento temporale nei nati + IVG

APPENDICE E

Bibliografia prodotta da ogni singolo RDC

Bibliografia Registro NEI

1. Clementi M, Tenconi R, Bianchi F, Botto L, Calabro A, Calzolari E, Cianciulli D, Mammi I, Mastroiacovo P, Meli P, Spagnolo A, Turolla L, Volpato S. Congenital eye malformations: a descriptive epidemiologic study in about one million newborns in Italy. *Birth Defects: Original Article Series* 1996;30(1):413-424.
2. Mees de A, Sarda P, Tenconi R, Ferrière M, Bouvagnet P. Blastogenesis dominant 1: a sequence with midline anomalies and heterotaxy. *American Journal of Medical Genetics* 1997;68:405-408.
3. Clementi M, Tenconi R, Forabosco P, Calzolari E, Milan M. Inheritance of cleft palate in Italy. Evidence for a major autosomal recessive locus. *Human Genetics* 1997;100:204-209.
4. Calzolari E, Bianchi F, Dolk H, Stone D, Milan M, Lechat M, Leurquin P, Goyens S, Astolfi G, Volpato S, Aymé S, Calabro A, Clementi M, Tenconi R, Cornel M, Cuschieri A, Garcia-Minaur S, Garne E, Gillerot Y, Goujard J, Hansen-Koenig D, Roulleaux M, Howard PJ, Johnson Z, Lilles DF, Nevin NC, Nelen V, Pexieder T, Pierini A, Stoll C, Svel I. Are omphalocele and neural tube defects related congenital anomalies? Data from 21 registries in Europe (EUROCAT). *American Journal of Medical Genetics* 1997;72:79-84.
5. Dolk H, Vrijheid M, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, Garne E, Nelen V, Robert E, Stone D, Tenconi R. Risk of congenital anomalies near hazardous waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. *The Lancet* 1998;352:423-427.
6. Dolk H and the EUROHAZCON Collaborative Group (Vrijheid M, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, Garne E, Nelen V, Robert E, Stone D, Tenconi R). Author's reply to the Editor letter "Landfill sites and congenital abnormalities". *The Lancet* 1998;352:1705.
7. Clementi M, Di Gianantonio E, Pelo E, Mammi I, Basile RT, Tenconi R. Methimazole embryopathy: Delineation of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics* 1999;83:43-46.
8. Clementi M, Bianca S, Benedicenti F, Tenconi R. Down syndrome and parity. *Community Genetics* 1999;2:18-22.
9. Mastroiacovo P, Mazzone T, Addis A, Elephant E, Carlier P, Vial T, Garbis H, Robert E, Bonati M, Ornoy A, Finardi A, Schaffer C, Caramelli L, Rodriguez-Pinilla E, Clementi M. High vitamin A intake in early pregnancy and major malformations: a multicenter prospective controlled study. *Teratology* 1999;59:7-11.
10. Lin AE, Birch PH, Korf BR, Tenconi R, Niimura M, Poyhonen M, Uhas KA, Sigorini M, Virdis R, Romano C, Bonioli E, Wolkenstein P, Pivnick EK, Lawrence M, Friedman JM, and the NNFF International Database Participants. Cardiovascular malformations and other cardiovascular abnormalities in Neurofibromatosis type I. *American Journal of Medical Genetics* 2000;95:108-117.
11. Boyd PA, Wellesley DG, de Walle HEK, Tenconi R, Garcia-Minaur S, Zandwijken GRJ, Stoll C, Clementi M. Evaluation of the prenatal diagnosis of neural tube defects by ultrasonographic examination in different centres across Europe. *Journal of Medical Screening* 2000;7:169-174.
12. Clementi M, Tenconi R, Bianchi F, Stoll C and the EUROSCAN study group. Evaluation of prenatal diagnosis of cleft lip with or without cleft palate and cleft palate by ultrasound: experience from 20 European registries. *Prenatal Diagnosis* 2000;20:870-875.
13. Stoll C, Wiesel A, Queisser-Luft A, Froster U, Bianca S, Clementi M & Euroscan Group. Evaluation of the prenatal diagnosis of limb reduction deficiencies. *Prenatal Diagnosis* 2000;20:811-818.
14. Stoll C, Tenconi R, Clementi M and the Euroscan Study Group. Detection of congenital anomalies by fetal ultrasonographic examination across Europe. *Community Genetics* 2001;4:225-232.
15. Garne E, Stoll C, Clementi M, & the Euroscan Group. Evaluation of Prenatal Diagnosis of Congenital Heart Diseases by Ultrasound: Experience from 20 European Registries. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2001;17:386-391.

16. Stoll C, Garne E, Clementi M. Evaluation of prenatal diagnosis of associated congenital heart diseases by fetal ultrasonographic examination in Europe. *Prenatal Diagnosis* 2001;21:243-252.
17. Barisic I, Clementi M, Häusler M, Kern J and EUROSCAN Study Group. Evaluation of Prenatal Ultrasound Diagnosis of Fetal Abdominal Wall Defects by 19 European Registries. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2001;18:309-316.
18. Di Gianantonio E, Schaefer C, Mastroiacovo P, Cournot MP, Benedicenti F, Reuvers M, Occupati B, Robert E, Bellemin B, Addis A, Arnon J, and Clementi M. Adverse effects of prenatal methimazole exposure. *Teratology* 2001;64:262-266.
19. Clementi M, Stoll C. The EUROSCAN study. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2001;18(4):297-300.
20. De Vigan C, Baena N, Cariati E, Clementi M, Stoll C. Contribution of ultrasonographic examination to the prenatal detection of chromosomal abnormalities in 19 centres across Europe. *Annales de Génétique* 2001;44:209-217.
21. Vrijheid M, Dolk H, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, Fazarinc I, Garne E, Ide R, Nelen V, Robert E, Scott JES, Stone D, Tenconi R. Risk of chromosomal congenital anomalies in relation to residence near hazardous waste landfill sites in Europe. *The Lancet* 2002;359:320-322.
22. Häusler MCH, Berghold A, Stoll C, Barisic I, Clementi M. Prenatal ultrasonographic detection of gastrointestinal obstruction: results from 18 European congenital anomaly registries. *Prenatal Diagnosis* 2002;22:616-623.
23. Garne E, Häusler M, Barisic I, Gjergja R, Stoll C, Clementi M. Congenital diaphragmatic hernia: evaluation of prenatal diagnosis in 20 European regions. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2002;19:329-333.
24. Clementi M, Di Gianantonio E, Ornoy A. Teratology information services in Europe and their contribution to the prevention of congenital anomalies. *Community Genetics* 2002;5:5-7.
25. Dolk H, Vrijheid M, Scott JES, Addor MC, Botting B, de Vigan C, de Walle H, Garne E, Loane M, Pierini A, Garcia-Minaur S, Physick N, Tenconi R, Wiesel A, Calzolari E, Stone D: Towards the Effective Surveillance of Hypospadias. *Environmental Health Perspectives* 2004;112(3):398-402.

Bibliografia IMER

1. Rubini M, Carturan S, Bononi I, And Calzolari E. Genomic organization and expression of the MTHFR gene. *American Journal of Human Genetics* 2000;67(4) suppl.1 (1002).
2. Lorente C, Cordier S, Bergeret A, De Walle He, Goujard J, Ayme S, Knill-Jones R, Calzolari E, Bianchi F. Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 2000;26(2):137-145.
3. Lorente C, Cordier S, Goujard J, Ayme S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle He, Knill-Jones R. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *American Journal of Public Health* 2000;Mar;90(3):415-419.
4. Bianchi F, Calzolari E, Ciulli L, Cordier S, Gualandi F, Pierini A, Mossey P. Environment and genetics in the etiology of cleft lip and cleft palate with reference to the role of folic acid. *Epidemiologia & Prevenzione* 2000;Jan-Feb;24(1):21-27. Review. Italian.
5. Magnani C, Bussolati G, Gambini L, Garani GP, Bosi G, Cocchi G, Garavelli L, Calzolari E. Congenital cardiopathy in a data-based population. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 2000;71(1):483-486. Italian.

6. Vinceti M, Rovesti S, Bergomi M, Calzolari E, Candela S, Campagna A, Milan M, Vivoli G. Risk of birth defects in a population exposed to environmental lead pollution. *The Science of the total environment* 2001;278(1-3):23-30.
7. Bianchi F, Linzalone N, Catalano S, Bianca S, Calzolari E, Mammi I, Scarano G. Parental agricultural work and risk of congenital anomalies:a registry based case-control study in Italy. *La Medicina del Lavoro* 2002;93(5):399-400.
8. Bosi G, Garani G, Scorrano M, Calzolari E, and the IMER Working Party. Temporal variability in birth prevalence of congenital heart defects as recorded by a general birth defects registry. *The Journal of Pediatrics* 2003;June:690-698.
9. Calzolari E, Garani G, Cocchi G, Magnani C, Rivieri F, Neville A, Astolfi G, Baroncini A, Garavelli L, Gualandi F, Scorrano M, Bosi G, IMER Working group. Congenital heart defects:15 years of experience of the Emilia-Romagna Registry (Italy). *European Journal of Epidemiology* 2003;18(8):773-780.
10. Dolk H, Vrijheid M, Scott JES, Addor MC, Botting B, de Vigan C, de Walle H, Garne E, Loane M, Pierini A, Garcia-Minaur S, Physick N, Tenconi R, Wiesel A, Calzolari E, Stone D. Towards the Effective Surveillance of Hypospadias. *Environmental Health Perspectives* 2004;112(3):398-402.
11. Calzolari E, Bianchi F, Rubini M, Ritvanen A, Neville AJ, EUROCAT Working Group. Epidemiology of cleft palate in Europe:implication for genetic research. *The Cleft palate Craniofacial Journal* 2004;41(3):244-249.
12. Rubini M, Brusati R, Garattini G, Magnani C, Liniero F, Bianchi F, Tarantino E, Massei A, Pollastri S, Carturan S, Amadori A, Bertagnin E, Cavallaro A, Fabiano A, Franchella A, Calzolari E. Cistationine beta-synthase c.844ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate. *The American Journal of Medical Genetics A*. 2005;136(4):368-372.
13. Busby A, Armstrong B, Dolk H, Armstrong N, Haeusler M, Berghold A, Gillerot Y, Baguette A, Gjergja R, Barisic I, Christiansen M, Goujarda J, Steinbicker V, Rosch C, McDonnell R, Scarano G, Calzolari E, Neville A, Cocchi G, Bianca S, Gatt M, Walle Hd, Braz P, Latos-Bielenska A, Genner B, Portillo I, Addor Mc, Abramsky L, Ritvanen A, Robert-Gnansia E, Daltveit Ak, Aneren G, Olars B, Edwards G, (2005):Preventing neural tube defects in Europe:a missed opportunity. *Reproductive Toxicology* 2005;20(3):393-402.

Bibliografia RTDC

1. andela S and Bianchi F. Studio europeo su occupazione materna e malformazioni congenite. *Epidemiologia & Prevenzione* 1996;20:183-185.
2. Clementi, M, Tenconi R, Bianchi F, Botto L, Calabro A, Calzolari E, Cianciulli D, Mammi I, Mastroiacovo P, Meli P, Spagnolo A, Turolla L, Volpato S. Congenital eye malformations: a descriptive epidemiologic study in about one million newborns in Italy. *Birth Defects: Original Article Series* 1996;30(1):413-424.
3. Bianchi F, Cianciulli D, Pierini A e Seniori Costantini A. Congenital malformations and maternal occupation: a registry based case-control study. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 1997;54(4):223-228.
4. Cordier S, Bergeret A, Goujard J, Ha MC, Ayme S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle HE, Knill-Jones R, Candela S, Dale I, Dananche B, de Vigan C, Fevotte J, Kiel G, Mandereau L. Congenital malformations and maternal occupational exposure to glycol ethers. *Epidemiology* 1997;8(4):355-363.
5. Calzolari E, Bianchi F, Dolk H, Stone D, Milan M, and EUROCAT Working Group. Are Omphalocele and Neural Tube Defects Related Congenital Anomalies? Data From 21 Registries in Europe (EUROCAT). *The American Journal of Medical Genetics* 1997;72:79-84.

6. Dolk H, Vrijheid M, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, Garne E, Nelen V, Robert E, Stone D, Tenconi R. Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. *The Lancet* 1998;352(9126):423-427.
7. Bianchi F, Calzolari E, Ciulli L, Cordier S, Gualandi F, Pierini A, Mossey P. Ambiente e genetica nell'eziologia delle labioschisi e palatoschisi con particolare riferimento al ruolo dell'acido folico. *Epidemiologia e prevenzione* 2000;24(1):21-27.
8. Lorente C, Cordier S, Bergeret A, De Walle HEK, Goujard J, Aymé S, Knill-Jones R, Calzolari E, Bianchi F. Maternal occupational risk factors for oral clefts. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 2000;26(2):137-145.
9. Lorente C, Cordier S, Goujard J, Aymé S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle HEK, Knill-Jones R. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. *American Journal of Public Health* 2000;90:3,415-419.
10. De Vigan C, Baena N, Cariati E, Clementi M, Stoll C, Bianchi F, Group Euroscan Working. Contribution of ultrasonographic examination to the prenatal detection of chromosomal abnormalities in 19 centres across Europe. *Annales de Génétique* 2001;44,209-217.
11. Stoll C, Tenconi R, Clementi M, Bianchi F, Group Euroscan Study. Detection of congenital anomalies by fetal ultrasonographic examination across Europe. *Community Genetics* 2001;4,225-232.
12. Bianchi F, Minichilli F, Pierini A, Salerno P, Taruscio D e Gruppo collaborativo dei Registri Italiani sulle Malformazioni Congenite. Registro Nazionale Malattie Rare. Epidemiologia di 44 malformazioni congenite rare in Italia. *Rapporto ISTISAN*, pagg. 1-174. Istituto Superiore di Sanità, 2002.
13. Vrijheid M, Dolk H, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, Fazarinc I, Garne E, Ide R, Nelen V, Robert E, Scott JES, Stone D, Tenconi R. Chromosomal congenital anomalies and residence near hazardous waste landfill sites. *The Lancet* 2002;359:320-322.
14. Bianchi F, Botto L, Caramelli L, Carmignani A, Di Tanna GL, Dukic T, Garcia Bonillo SC, Mastroiacovo P, Pierini A, Scarinci R, Sorace M, Strigini F, Watkins M. Folic Acid in Tuscany, Italy: what do women know, think, and do? Atti del XXX Annual Meeting International Clearinghouse For Birth Defects Monitoring Systems, 19 September 2003, Clermont-Ferrand.
15. Dolk H, Vrijheid M, Scott JES, Addor MC, Botting B, de Vigan C, de Walle H, Garne E, Loane M, Pierini A, Garcia-Minaur S, Physick N, Tenconi R, Wiesel A, Calzolari E, Stone D: Towards the Effective Surveillance of Hypospadias. *Environmental Health Perspectives* 2004;112(3):398-402.
16. Minichilli F, Linzalone N, Pierini A, Calzolari E, Scarano G, Bianchi F: Studio epidemiologico sul rischio di malformazioni congenite in prossimità di siti di discarica in due regioni italiane. *Rapporto ISTISAN 04/5*, pagg. 86-104, 2004.
17. Calzolari E, Bianchi F, Rubini M, Ritvanen A, Neville AJ, EUROCAT Working Group. Epidemiology of cleft palate in Europe: implications for genetic research. *The Cleft Palate Craniofacial Journal* 2004;41,3,244-249.
18. Garne E, Loane M, Dolk H, de Vigan C, Scarano G, Tucker D, Stoll C, Gener B, Pierini A, Nelen V, Rösch C, Gillerot Y, Feijoo M, Tincheva R, Quisser-Luft A, Addor MC, Mosquera C, Gatt M, Barisic I: Prenatal diagnosis of severe structural congenital malformations in Europe. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2005;25(1):6-11.
19. Rubini M, Brusati R, Garattini G, Magnani C, Liviero F, Bianchi F, Tarantino E, Massei A, Pollastri S, Carturan S, Amadori A, Bertagnin E, Cavallaro A, Fabiano A, Franchella A, Calzolari E. Cystothionine beta-synthase c.84ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate. *American Journal of Medical Genetics* 2005;136(4):368-372.
20. Calzolari E, Pierini A, Astolfi G, Bianchi F, Neville AJ, Rivieri F and EUROCAT Working Group.: Associated anomalies in multi-malformed infants with Cleft lip and Palate: An epidemiological study based on 6 million births in 23 EUROCAT Registries. *American Journal of Medical Genetics*, in press 2006.

Bibliografia RCDC

1. Corchia C, Mastroiacovo P, Lanni R, Grimaldi V, Scarano G, Baronciani D. Social and geographical inequalities in prenatal care in Italy. *Prenat Diagn* 1995;15(6):535-540.
2. D'Argenio P, Scarano G, Palma G, Vosa C, Arsieri R. Stima della prevalenza e qualità della diagnosi delle cardiopatie congenite severe in età neonatale. *Rivista Italiana di Pediatria (IJP)* 1996;22:36-41.
3. Cocchi G, Scarano G *et al.* Diagnosi Prenatale e prevalenza alla nascita della sindrome di Down. *Rivista Italiana di Pediatria (IJP)* 1999;25:756-759.
4. Registro Nazionale malattie rare. Epidemiologia di 44 malformazioni congenite rare in Italia. Rapporti Istisan n. 36, 2002 a cura di Bianchi F e Taruscio D e Gruppo Registri Italiani Malformazioni Congenite.
5. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, Lopez MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martinez-Frias ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet.* 2003;40(8):619-625.
6. Minichilli F, Linzalone N, Pierini A, Calzolari E, Scarano G, Bianchi F. "Studio epidemiologico sul rischio di Malformazioni Congenite in prossimità di siti di discarica in due regioni italiane" in "Valutazione del rischio sanitario ed ambientale nello smaltimento dei rifiuti urbani e pericolosi" Rapporti Istisan n.5, 2004 a cura di Musumeci L.
7. Garne E, Loane M, de Vigan C, Scarano G, de Walle H, Gillerot Y, Stoll C, Addor MC, Stone D, Gener B, Feijoo M, Mosquera-Tenreiro C, Gatt M, Queisser-Luft A, Baena N, Dolk H. Prenatal diagnostic procedures used in pregnancies with congenital malformations in 14 regions of Europe. *Prenatal Diagnosis* 2004;24(11):908-912.
8. Lonardo F, Della Monica M, Riccardi G, Riccio I, Riccio V and Scarano G. Family with X-linked recessive fusion of metacarpals IV and V. *American Journal of Medical Genetics* 2004;124:407-410.
9. Nazzaro A, Della Monica M, Lonardo F, Di Blasi A, Baffico M, Baldi M, Nazzaro G, De Placido G and Scarano G. Prenatal ultrasound diagnosis of a case of Pfeiffer syndrome without cloverleaf skull and review of the literature. *Prenatal Diagnosis* 2004;24:918-922.
10. Garne E, Loane M, Dolk H, De Vigan C, Scarano G, Tucker D, Stoll C, Gener B, Pierini A, Nelen V, Rosch C, Gillerot Y, Feijoo M, Tincheva R, Queisser-Luft A, Addor MC, Mosquera C, Gatt M, Barisic I. Prenatal diagnosis of severe structural congenital malformations in Europe. *Ultrasound Obstetrics and Gynecology* 2005;25(1):6-11.
11. Lisi A, Botto LD, Rittler M, Castilla E, Bianchi F, Botting B, De Walle H, Erickson JD, Gatt M, De Vigan C, Irgens L, Johnson W, Lancaster P, Merlob P, Mutchinick OM, Ritvanen A, Robert E, Scarano G, Stoll C, Mastroiacovo P. Sex and congenital malformations: an international perspective. *American Journal of Medical Genetics A.* 2005;134:49-57.
12. Botto LD, Lisi A, Robert-Gnansia E, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Botting B, Cocchi G, de Vigan C, de Walle H, Feijoo M, Irgens LM, McDonnell B, Merlob P, Ritvanen A, Scarano G, Siffel C, Metneki J, Stoll C, Smithells R, Goujard J. International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendations: are the recommendations working? *British Medical Journal* 2005;330(7491):571-73.

13. Della Monica M, Nazzaro A, Lonardo F, Ferrara G, Di Blasi A and Scarano G. Prenatal diagnosis of cloacal exstrophy with myelocystocele complex in early second trimester by the “elephant trunk-like” image and review of the literature. *Prenatal Diagnosis* 2005; 25:394-397.
14. Busby A, Armstrong B, Dolk H, Armstrong N, Haeusler M, Berghold A, Gillerot Y, Baguette A, Gjergia R, Barisic I, Christiansen M, Goujard J, Steinbicker V, Rosch C, McDonnell R, Scarano G, Calzolari E, Neville A, Cocchi G, Bianca S, Gatt M, Walle HD, Braz P, Latos-Bielenska A, Gener B, Portillo I, Addor MC, Abramsky L, Ritvanen A, Robert-Gnansia E, Daltveit AK, Anneren G, Olars B, Edwards G. Preventing neural tube defects in Europe: A missed opportunity. *Reproductive Toxicology* 2005;20(3):393-402.
15. Botto LD, Lisi A, Robert-Gnansia E, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Botting B, Cocchi G, de Vigan C, de Walle H, Feijoo M, Irgens LM, McDonnell B, Merlob P, Ritvanen A, Scarano G, Siffel C, Metneki J, Stoll C, Smithells R, Goujard J. International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendations: are the recommendations working? *British Medical Journal* 2005;330(7491):571.

Bibliografia ISMAC

1. Bianca S, Ettore G, Guarnera S, Meli S, Mollica F. The relationship between congenital cardiovascular malformations and spontaneous abortion in preceding pregnancy. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 1999;13:236.
2. Stoll C, Wiesel A, Queisser-Luft A, Froster U, Bianca S, Clementi M and Euroscan study group. Evaluation of prenatal diagnosis of limb reduction deficiencies. *Prenatal Diagnosis* 2000;10:811-8.
3. Bianca S, Ettore G. Anorectal Malformations and Down Syndrome. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2000; 14:372.
4. Bianca S, Ettore G. Sex Ratio imbalance in transposition of the great arteries and possible agricultural environmental risk factors. *Images Paediatric Cardiology* 2001;8:10-14.
5. Bianca S, Bianca M, Bonaffini F, Ettore G. The role of maternal reproductive history in the etiology of neural tube defects. *Medical Hypotheses* 2002;58:113-114.
6. Bianca S, Ettore G. Maternal reproductive history and isolated hypoplastic left heart syndrome. *Acta Cardiologica*, 2002;57:407-408.
7. Bianca S, Ingegnosi C, Ettore G. Reproductive risk factors in unilateral and bilateral renal agenesis. *Congenital Anomalies(Kyoto)* 2003;43:79-80.
8. Wiesel A, Queisser-Luft A, Clementi M, Bianca S, Stoll C and the EUROSCAN Study Group. Prenatal Detection of Congenital Renal Malformations by Fetal Ultrasonographic Examination: An Analysis of 709,030 Births in 12 European Countries. *European Journal of Medical Genetics* 2005;48:131-144.
9. Busby A, Abramsky L, Dolk H, Armstrong B, Addor MC, Anneren G, *et al.* Preventing neural tube defects in Europe: A missed opportunity. *Reproductive Toxicology* 2005;20:393-402. [Erratum *Reproductive Toxicology* 2006;21:116]

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, settembre 2006 (n. 3) 18° Suppl.