

# Riflessioni sulla prevenzione primaria dei difetti del tubo neurale in Italia e spunti per una raccomandazione basata sulle evidenze più recenti

Pierpaolo Mastroiacovo, Carlo Corchia

Alessandra Lisi International Centre on Birth Defects and Prematurity, Roma

La supplementazione pre-concezionale con acido folico abbassa il rischio di difetti del tubo neurale e probabilmente anche di altre importanti condizioni congenite. La strategia adottata dai Paesi europei, compresa l'Italia, prevede l'inizio dell'assunzione di 0,4 mg/die di acido folico da parte delle donne prima del concepimento.

Una serie di studi ha dimostrato che quanto più è alta la folatemia eritrocitaria pre-concezionale tanto più basso è il rischio di difetti del tubo neurale e che il tempo occorrente per raggiungere il valore di folatemia che massimizza la riduzione del rischio, cioè 1400 nmol/l, è funzione della folatemia di base. Pertanto, la strategia migliore da applicare in Italia deve prevedere la prescrizione dell'acido folico da parte del medico alle donne dal momento in cui iniziano a programmare una gravidanza o non ne escludono del tutto la possibilità. Poiché il tempo necessario per raggiungere i valori di folatemia che massimizzano la riduzione del rischio partendo da quelli medi delle donne italiane può anche essere di 40 settimane, le indicazioni del tipo "iniziare la supplementazione 1 o 3 mesi prima del concepimento" vanno evitate.

*It is well known that pre-conceptual folic acid intake decreases the risk of neural tube defects and probably of other serious birth conditions. The strategy adopted by European Countries provides that women take 0,4 mg folic acid/die before conception. Data from studies analysing a) the relationship between pre-conceptual erythrocyte folate concentration and risk of neural tube defects and b) the time interval needed to reach the erythrocyte folate levels that maximizes the reduction in risk, that is 1400 nmol/l, suggest that the best strategy to be adopted in Italy is to actively prescribe the supplementation to all women planning or not excluding the possibility of a pregnancy. Because the average time required to reach the erythrocyte folate concentration that maximizes the risk reduction may be as long as 40 weeks, indications given to women such as "start the supplementation 1 or 3 months before conception" should be avoided.*

## Introduzione

Le evidenze che dimostrano la possibilità di ridurre la frequenza dei difetti del tubo neurale (DTN) attraverso un maggior apporto di acido folico (AF) sono numerose, di vario tipo, robuste e ampiamente note [1-6].

Le strategie di prevenzione adottate dai Ministeri della Salute, o analoghe organizzazioni di sanità pubblica, di quasi tutte le nazioni europee ed extra-europee sono di due tipi: (a) fortificazione degli alimenti più comunemente usati nella popolazione target per assicurare a tutte le donne in età fertile, che programmano o no la gravidanza, un apporto aggiuntivo di 0,2-0,4 mg/die di AF, accompagnata o no da una

raccomandazione di aumentare l'assunzione di AF nel periodo pre-concezionale<sup>1</sup> (es. Stati Uniti, Canada, Cile, Australia); (b) soltanto la raccomandazione alle donne di aumentare l'assunzione di AF nel periodo pre-concezionale (in seguito indicata semplicemente come "raccomandazione") adottata in Europa, compresa l'Italia [7]. Mentre il primo tipo di strategia ha dimostrato un chiaro successo, con riduzione della frequenza dei DTN variabile tra il 30% e il 70% in funzione della frequenza pre-fortificazione (figura 1) [4,8-16], quella basata soltanto sulla raccomandazione della supplementazione, nelle modalità adottate in Europa fino al 2000, si è dimostrata del tutto inefficace a cau-

sa della bassa prevalenza d'uso della supplementazione pre-concezionale [17-19]. Recentemente, tuttavia, tale prevalenza è leggermente aumentata, sebbene sia ancora insoddisfacente e inferiore all'obiettivo richiesto per ottenere un'equità socio-sanitaria del 100%; per es. in Francia 2010: 14,8% [20], in Norvegia 1999-2009: 31,3% [21], in Irlanda 2009: 36,0% [22], in Olanda 2009-2010: 55,5% [23] e in Italia 2012: 23,5% [24].

Esiste inoltre un'ampia eterogeneità nella formulazione delle varie raccomandazioni, soprattutto in Europa [25], e si nota scarsa chiarezza dei messaggi divulgativi. Basta navigare in internet per rendersi conto della confusione esistente, in particolare nelle informazioni rivolte alle donne, in cui spesso si insiste sul periodo gravidico e poco o di sfuggita su quello pre-concezionale.

Si impone quindi una riflessione su quali basi e su come debba essere formulata una raccomandazione, in particolare in Italia, unico Paese in cui la supplementazione con 0,4 mg/die di AF è fornita gratuitamente dal SSN su prescrizione del medico di medicina generale [26].

## Le basi

### La prevalenza dei DTN in Italia

La prevalenza "totale" dei DTN, che tiene conto dei nati vivi, dei nati morti e delle IVG dopo diagnosi prenatale, nel quinquennio più recente disponibile (2008-2012) può essere stimata soltanto grazie ai dati di due registri regionali di

<sup>1</sup> La dizione "pre-concezionale" sottolinea il periodo in cui va assunto l'AF, ma comprende anche l'assunzione nel primo trimestre di gravidanza.

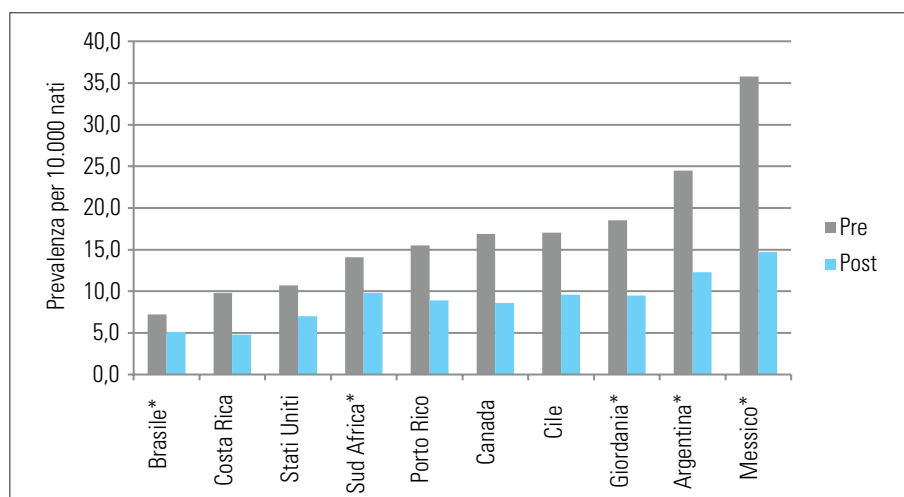


Figura 1. Decremento della prevalenza dei DTN in 10 Nazioni in cui è stato studiato l'effetto nella popolazione o in un gruppo di ospedali \* prima (Pre) e dopo (Post) la fortificazione obbligatoria delle farine alimentari [4, 8-16].

malformazioni, quelli di Emilia Romagna e Toscana, che considerati insieme forniscono una stima di prevalenza di DTN del 5,78 per 10.000 [27]. La validità di questo dato non è mai stata dimostrata. Si può soltanto rilevare che i tassi osservati in questi due registri sono tra i quattro più bassi (inferiori al 6,0 per 10.000) tra quelli registrati in un totale di 28 registri europei [19,27]. Inoltre, in uno studio di validità dei tassi della sindrome di Down registrati negli anni 2001-2005 è stato osservato un sotto-accertamento del 37% e 51% rispettivamente per il registro dell'Emilia Romagna e della Toscana [28]. È possibile che negli anni seguenti il sotto-accertamento sia stato corretto almeno in parte, ma è suggestivo ipotizzare che anche per i DTN, caratterizzati come per la sindrome di Down da elevata proporzione di IVG dopo diagnosi prenatale, esista una qualche quota di sotto-accertamento. Inoltre non sappiamo se i dati della Toscana e dell'Emilia Romagna possano essere considerati una stima attendibile della frequenza di DTN in tutta Italia. Se si assume come ragionevole una sottostima del 35%, si può pensare che la prevalenza totale dei DTN in Italia possa essere del 9,0 per 10.000 nati (che corrisponde attualmente, con un numero intorno a 500.000 nati/anno, a circa 450 casi/anno).

#### Quale riduzione del rischio di DTN in Italia ci possiamo aspettare da una maggiore assunzione di acido folico?

La riduzione relativa dei DTN (espressa quindi come percentuale di decremento) attribuibile a una maggiore assunzione di AF è funzione principalmente del rischio di base: tanto più è elevato il rischio di base tanto maggiore è la riduzione relativa. L'entità della riduzione, pertanto, non può

essere trasferibile come tale da una realtà all'altra. Ciò è ben dimostrato sia dagli studi pre- e post-fortificazione citati in precedenza (figura 2) che dallo studio condotto in Cina che ha valutato l'effetto della supplementazione di 0,4 mg/die di AF nel periodo pre-concezionale e in cui è stata osservata una riduzione del rischio di DTN del 79% in Cina del Nord, dove il rischio di base era del 65 per 10.000 e del 41% in Cina del Sud, dove il rischio di base era dell'8 per 10.000 [3].

Per capire bene quale sarebbe la riduzione del rischio ottenibile con una maggiore assunzione di AF è molto più utile utilizzare i due studi di correlazione tra folatemia (si intende qui e di seguito quella eritrocitaria, più stabile e informativa di quella plasmatica) all'inizio della gravidanza e rischio di DTN effettuati in Irlanda e in Cina, i quali forniscono risultati del tutto sovrapponibili e validi, tanto da essere stati utilizzati dall'OMS per elaborare recenti raccomandazioni [5,6,29,30].

La figura 3 fornisce i dati basati sul modello di correlazione sviluppato dalle osservazioni effettuate in Cina [6]. Si può osservare che l'assunzione di acido folico nel periodo pre-concezionale consente di ridurre il rischio di DTN intorno al 9,0 per 10.000 se la folatemia media nei primi giorni della gravidanza è circa 900 nmol/l e fino al 4,5 per 10.000 se la folatemia raggiunge valori intorno a 1400 nmol/l. Al di sopra di questi valori l'ulteriore riduzione sembra essere minima se mai esistente.

#### Qual è il valore di folatemia nelle donne italiane all'inizio della gravidanza?

Per quanto riguarda i valori di folatemia nelle donne italiane all'inizio della gravidanza, non esiste a nostra conoscenza

alcun dato. Dobbiamo pertanto fare riferimento alla folatemia nelle donne in generale, possibilmente in età fertile.

Uno studio condotto su donne donatrici di sangue svolto in Molise, i cui risultati sono analoghi a quelli di altri studi svolti in Italia, ha indicato una folatemia eritrocitaria nelle donne di 15-44 anni di 366 nmol/l [31]. Considerando che tale valore è stato ottenuto con metodo immunologico (*Che-miluminescent Microparticle Immunoassay*) tramite apparecchiatura Architect i2000 della Abbott, l'equivalente valore ottenuto con metodo microbiologico risulterebbe di 695 nmol/l [32, 33]. Questo valore è del tutto simile a quello di 686 nmol/l osservato negli Stati Uniti nel 1988-1994 nelle donne di 15-44 anni prima dell'introduzione della fortificazione degli alimenti [34]. Negli Stati Uniti negli anni 1999-2011, cioè dopo l'introduzione della fortificazione, la folatemia media è salita a 1060 nmol/l [26]. In quel Paese, la prevalenza di DTN (encefalopatia + spina bifida) prima della fortificazione (anni 1995-1996) nei programmi di sorveglianza con accertamento prenatale era di 10,7 per 10.000; negli anni dopo la fortificazione (1999-2011) la prevalenza dei DTN è scesa a 7,0 per 10.000 [10]. È interessante tra l'altro notare che la folatemia media nelle donne statunitensi in età fertile varia in funzione dell'assunzione o meno di supplementi contenenti AF; per esempio, la folatemia media è di 926 nmol/l nelle donne che non assumono supplementi e di 1370 nmol/l in quelle che assumono 0,4 mg o più/die di AF [35].

Da questi confronti appare chiaro che in Italia, nonostante gli scarsi dati disponibili, la folatemia è simile a quella statunitense pre-fortificazione, quindi inferiore ai livelli minimi di 906 nmol/l raccomandati dall'OMS per la popolazione generale [29] e molto inferiore a quelli che massimizzano la riduzione del rischio di DTN fino al 4,5 per 10.000. Inoltre va notato che la prevalenza dei DTN da noi stimata in Italia si avvicina a quella osservata negli Stati Uniti prima della fortificazione.

In conclusione, se in Italia la stima della prevalenza totale dei DTN del 9,0 per 10.000 è plausibile e se la folatemia delle donne in età fertile è bassa, si impone una strategia efficace per aumentarla fino a 1400 nmol/l. Secondo questi assunti la riduzione ipotizzabile è quindi "fino al 50% di casi in meno", ovvero pari a 225 casi di DTN in meno ogni anno.

#### Come raggiungere livelli di folatemia che massimizzano la riduzione dei DTN con 0,4 mg/die di acido folico?

Una nostra revisione degli 8 studi che hanno valutato l'incremento della folate-

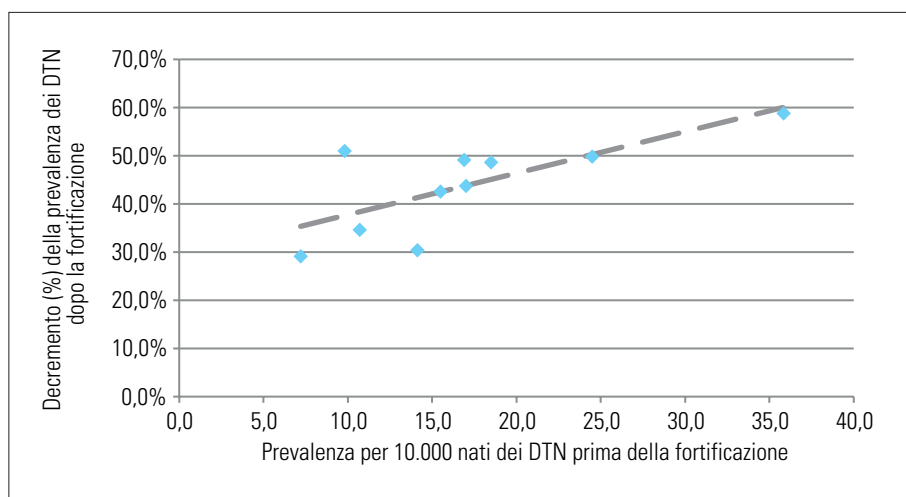


Figura 2. Relazione tra il decremento percentuale della prevalenza dei DTN dopo la fortificazione obbligatoria delle farine alimentari e tasso di prevalenza dei DTN per 10.000 osservato prima dell'inizio della fortificazione in 10 studi svolti in 10 popolazioni diverse [4,8-16].

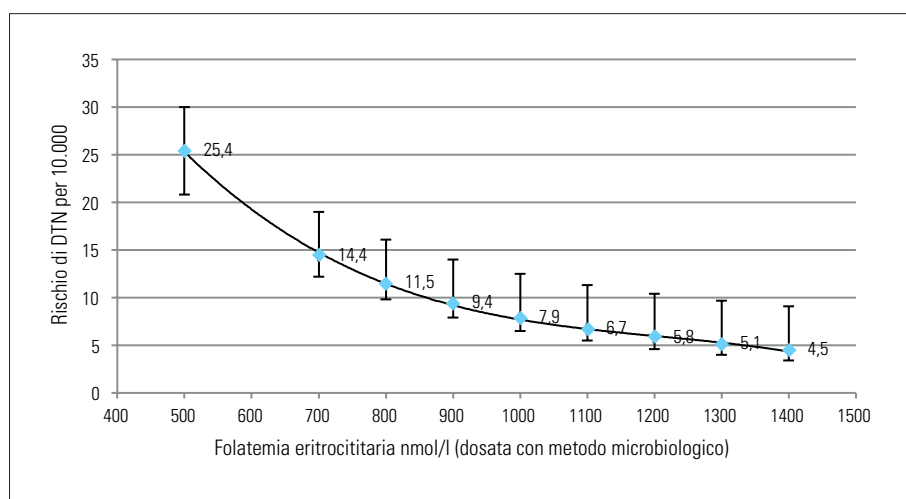


Figura 3. Relazione tra folatemia eritrocitaria dosata con metodo standard microbiologico e rischio di DTN per 10.000 [6].

mia (figura 4), dosata con metodo microbiologico, ottenuto con 0,4 mg/die di AF, indica che il livello di 906 nmol/l si raggiunge dopo 6-14 settimane di assunzione, un periodo di tempo peraltro variabile in funzione della folatemia di base, mentre quello di 1400 nmol/l viene raggiunto dopo 40 settimane (9-10 mesi) dall'inizio della supplementazione [36-42].

**Quali caratteristiche dovrebbe avere una raccomandazione basata sulla supplementazione con 0,4 mg/die di acido folico in Italia?**

**A chi deve essere rivolta la raccomandazione?**

In Italia l'acido folico 0,4 mg/cp è fornito gratuitamente dal SSN su prescrizione medica. La confezione da 120 cp per confezione è totalmente gratuita in alcune regioni, in altre è richiesto il pagamento di un ticket, in genere di 2 euro.

La raccomandazione va quindi innanzitutto diretta ai medici che hanno l'oppor-

tunità di un contatto con le donne (coppie) in età fertile, in particolare ai ginecologi, medici di famiglia, medici dei consultori familiari, ma anche ai pediatri di famiglia e ai genetisti, per convincerli a eseguire la prescrizione di 0,4 mg/die di AF.

**A chi va prescritto l'acido folico?**

Vi sono due possibilità:

- se la percentuale di bambini che nascono da una gravidanza programmata fosse elevata (diciamo 80-90%) la prescrizione potrebbe essere fatta a tutte le donne che programmano una gravidanza;
- se al contrario la percentuale di bambini che nascono da una gravidanza programmata fosse inferiore a questi valori la prescrizione andrebbe fatta a tutte le donne in età fertile<sup>2</sup>.

Una recente indagine condotta in sette ospedali italiani indica che la percentuale di nati da gravidanza programmata va-

lutata con tre domande come proposto da Morin [43] è del 64,5% (con range tra 52% a Benevento e 76,3% a Genova) [24]. *Se tale percentuale non è giudicata accettabile*, la scelta più ragionevole per assicurare una corretta supplementazione di acido folico a tutte le donne di qualsiasi stato sociale e con qualsiasi tipo di controllo della fertilità è pertanto che la prescrizione venga fatta a tutte le donne in età fertile, prescindere dal fatto che la coppia pensi di avere un figlio a breve termine o no. Tale opzione equivale alla prolungata assunzione di AF a dosaggi simili o inferiori tramite alimenti fortificati, come avviene in molti Paesi del mondo, e ha l'ovvio vantaggio di non escludere le donne che non programmano la gravidanza (probabilmente a maggior rischio di avere un figlio con DTN) e non si accompagna ad effetti collaterali di alcun tipo [44].

Questa opzione però, al momento attuale, appare insostenibile economicamente da parte del SSN<sup>3</sup> anche perché sfortunatamente manca una robusta evidenza che la maggiore assunzione di AF possa ridurre il rischio di altre condizioni congenite, ad esempio cardiopatie congenite, schisi ora-

<sup>2</sup> Si può notare che il nostro obiettivo non è tanto tenere in considerazione la percentuale di donne che programmano la gravidanza (ovvero avere come denominatore tutte le gravidanze al loro inizio, comprese quindi anche le IVG) ma la percentuale di bambini che nascono da una gravidanza programmata. Ciò è ragionevole: infatti, una interruzione di gravidanza non desiderata per la quale non è stato assunto acido folico non influisce sulla prevalenza dei DTN, indipendentemente dalla presenza o meno di difetti congeniti, che sono di fatto sconosciuti. Bisogna quindi tener conto solo dei bambini che nascono o sarebbero nati da una gravidanza desiderata ma interrotta dopo diagnosi prenatale di DTN.

<sup>3</sup> Si può calcolare che se tutte le donne in età fertile (16-45 anni), attualmente all'incirca 11 milioni, assumessero giornalmente una compressa di acido folico, il cui costo è di 13,40 euro per una confezione da 120 cp = 40,76 euro/anno, il costo complessivo sarebbe di 448 milioni all'anno per prevenire all'incirca 225 gravidanze affette (il 50% del 9 per 10.000 stimato su 500.000 nati) ovvero all'incirca 2 milioni di euro per una gravidanza che esiterà nella nascita di un neonato non affetto da DTN invece che in una IVG dopo diagnosi prenatale, di un nato morto o di un nato vivo con DTN. È ovvio che un tale scenario, al momento attuale poco vantaggioso economicamente, dovrebbe vedere diminuire il costo dell'acido folico a valori irrealistici, oppure prevedere anche altri vantaggi legati alla supplementazione di AF per i quali purtroppo manca ancora la prova di efficacia definitiva.

## BOX 1

L'assunzione di acido folico fin dal periodo pre-concezionale fa diminuire il rischio di difetti del tubo neurale e probabilmente anche di altre importanti condizioni congenite.

La prevalenza dei difetti del tubo neurale in Italia è probabilmente sottostimata e ancora lontana dal valore minimo considerato incompressibile.

I valori di folatemia eritrocitaria che massimizzano la riduzione del rischio possono essere raggiunti anche dopo diversi mesi dall'inizio della supplementazione con 0,4 mg di acido folico/die.

Il medico deve prescrivere l'acido folico alle donne dal momento in cui cominciano a pensare di programmare una gravidanza o non ne escludono del tutto la possibilità, evitando le indicazioni del tipo "iniziare la supplementazione 1 o 3 mesi prima del concepimento".

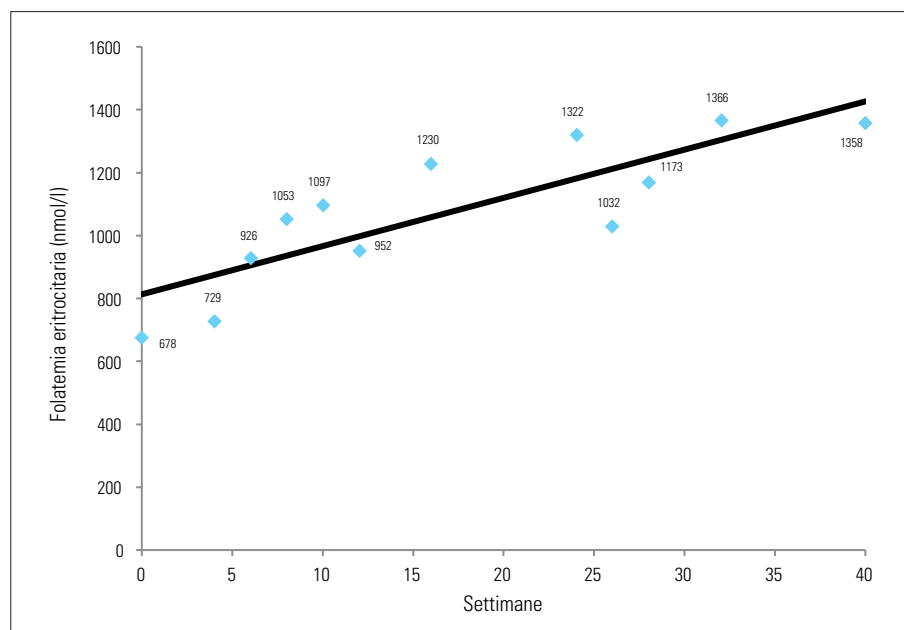


Figura 4. Incremento della folatemia eritrocitaria con 0,4 mg/die di acido folico, come stimata da otto studi che hanno utilizzato il metodo microbiologico per dosarla. Ogni punto rappresenta la media pesata di più studi. La linea continua rappresenta la linea di tendenza dell'incremento in funzione della folatemia iniziale.

li, autismo, ridotto accrescimento fetale e prematurità [45-51]. Dato che non è eticamente possibile proporre un trial randomizzato contro placebo per valutare la reale efficacia dell'AF nei confronti di tutte le condizioni potenzialmente prevenibili con AF, è necessario basare le decisioni e le raccomandazioni sui risultati di studi osservazionali, per quanto meno robusti. Auspichiamo venga messo in cantiere in tempi brevi l'unico studio che potrebbe fornire l'evidenza necessaria: quello di correlazione tra la folatemia all'inizio della gravidanza e la frequenza delle condizioni summenzionate.

Se la percentuale di nati da gravidanza programmata è invece giudicata accettabile la scelta più ragionevole è prescrivere 0,4 mg/die di AF a tutte le donne (coppie) che iniziano a pensare di avere un figlio o che è

possibile che lo abbiano perché non usano una contraccezione a elevata efficacia. Tale raccomandazione dovrà essere accompagnata da un rafforzamento dell'educazione all'uso di metodi contraccettivi efficaci e quindi alla programmazione delle gravidanze da parte delle coppie.

In ambedue le opzioni prospettate è indispensabile che ogni medico abbia un atteggiamento proattivo, ovvero sia abile nel proporre a ogni occasione di incontro con donne in età fertile, diretto o indiretto, tutti gli interventi efficaci a ridurre i fattori modificabili che diminuiscono il rischio di avere un figlio con alcune condizioni congenite, tra cui, *in primis*, l'assunzione di AF nel periodo che precede una possibile gravidanza [52].

Questo risultato potrà essere ottenuto solo attraverso un progetto di ECM, sostenuto

dal Ministero della Salute e dall'Istituto Superiore della Sanità, in grado di raggiungere tutti i medici italiani coinvolti nell'assistenza a donne in età fertile.

Una campagna informativa per la popolazione risulterà certamente utile per stimolare l'utenza target a porre domande appropriate ai medici distratti, non sufficientemente proattivi, e, in seconda istanza, per stimolare la scelta individuale di assumere l'AF durante tutto il periodo dell'età fertile.

#### Quando assumere la supplementazione e a quali dosi?

Da quanto detto il "quanto" è del tutto assodato: 0,4 mg/die. Il "quando" emerge dagli studi di cinetica dell'AF, ovvero almeno 10 mesi prima del concepimento, ma in termini pratici è opportuno indicare "dal momento in cui la donna (coppia) ritiene possibile l'inizio di una gravidanza nel medio o breve termine". In una raccomandazione quindi va evitato di indicare un determinato periodo di tempo prima del concepimento (per es. "almeno 1 mese" o "3 mesi prima") perché fuorviante e non utile a centrare l'obiettivo di massimizzare l'efficacia preventiva dell'AF.

#### Conclusioni

Oggigiorno abbiamo a disposizione maggiore esperienza (inefficacia delle attuali raccomandazioni, in tutta Europa e non solo in Italia) e maggiori informazioni (correlazione tra folatemia e rischio di DTN). In Italia abbiamo anche un contesto particolarmente favorevole (AF gratuito se prescritto dal medico). Tutto questo permette di pensare che la raccomandazione migliore sia quella rivolta ai medici, con l'obiettivo di renderli proattivi nel prescrivere a tutte le donne che possono avere una gravidanza nel breve-medio termine, per un preciso desiderio della coppia o per l'utilizzo di un metodo contraccettivo non efficace, 0,4 mg/die di AF, per poter ridurre fino al 50% il rischio di avere un figlio con un DTN, e per la ragionevole possibilità di ridurre anche il rischio di altre condizioni congenite.

#### Conflitti d'interesse

Nessuno.

✉ [icbd@icbd.org](mailto:icbd@icbd.org)

La bibliografia sarà consultabile online nella versione digitale dell'articolo.

## Bibliografia

1. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-7.
2. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327):1832-5.
3. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 1999;341:1485-90. Erratum in: *N Engl J Med* 1999;341:1864.
4. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med* 2007;357:135-42.
5. Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. *JAMA* 1995;274:1698-702.
6. Crider KS, Devine O, Hao L, et al. Population red blood cell folate concentrations for prevention of neural tube defects: bayesian model. *BMJ* 2014;349:g4554.
7. Network Italiano Promozione Acido Folico per la Prevenzione Primaria di Difetti Congeniti. Raccomandazione per la Riduzione del Rischio di Difetti Congeniti. <http://www.iss.it/acid/index.php?lang=1&tipo=11> (accesso 4/11/2015).
8. Pacheco SS, Braga C, Souza AI, Figueiroa JN. Effects of folic acid fortification on the prevalence of neural tube defects. *Rev Saude Publica* 2009;43:565-71.
9. Barboza Arguello Mde L, Umana Solis LM. Impact of the fortification of food with folic acid on neural tube defects in Costa Rica. *Rev Panam Salud Publica* 2011;30:1-6.
10. Williams J, Mai CT, Mulinare J, et al. Updated estimates of neural tube defects prevented by mandatory folic acid fortification - United States, 1995-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015;64:1-5.
11. Sayed AR, Bourne D, Pattinson R, Nixon J, Henderson B. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82:211-6.
12. Rosenthal J, Casas J, Taren D, Alverson CJ, Flores A, Frias J. Neural tube defects in Latin America and the impact of fortification: a literature review. *Public Health Nutr* 2014;17:537-50.
13. Nazer H J, Cifuentes O L. Effects of wheat flour fortification with folic acid on the prevalence of neural tube defects in Chile. *Rev Med Chil* 2013;141:751-7.
14. Amarin ZO, Obeidat AZ. Effect of folic acid fortification on the incidence of neural tube defects. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2010;24:349-51.
15. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM. Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A*. 2010 Oct;152A(10):2444-58.

16. Castillo-Lancellotti C, Tur JA, Uauy R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. *Public Health Nutr* 2013;16:901-11. Erratum in: *Public Health Nutr* 2013;16:1527.
17. Botto LD, Lisi A, Robert-Gnansia E, et al. International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendations: are the recommendations working? *BMJ* 2005;330:571.
18. Busby A, Abramsky L, Dolk H, et al. Preventing neural tube defects in Europe: a missed opportunity. *Reprod Toxicol* 2005;20:393-402. Erratum in: *Reprod Toxicol* 2006;21:116.
19. Khoshnood B, Loane M, Walle Hd, et al. Long term trends in prevalence of neural tube defects in Europe: population based study. *BMJ* 2015;351:h5949.
20. Tort J, Lelong N, Prunet C, Khoshnood B, Blondel B. Maternal and health care determinants of preconceptional use of folic acid supplementation in France: results from the 2010 National Perinatal Survey. *BJOG* 2013; 120(13):1661-7.
21. Nilsen RM, Mastroiacovo P, Gunnes N, et al. Folic acid supplementation and interpregnancy interval. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2014;28:270-4.
22. Delany C, McDonnell R, Robson M, Corcoran S, Fitzpatrick C, De La Harpe D. Folic acid supplement use in the prevention of neural tube defects. *Ir Med J* 2011;104:12-5.
23. Manniën J, de Jonge A, Cornel MC, Spelten E, Hutton EK. Factors associated with not using folic acid supplements preconceptionally. *Public Health Nutr* 2013;10:1-7.
24. Mastroiacovo P, Nilsen RM, Leoncini E, et al. Prevalence of maternal preconception risk factors: an Italian multicenter survey. *Ital J Pediatr* 2014;40:91.
25. Cawley S, Mullaney L, McKeating A, Farren M, McCartney D, Turner MJ. A review of European guidelines on periconceptional folic acid supplementation. *Eur J Clin Nutr* 2015; Sep 9. doi: 10.1038/ejcn.2015.131.
26. Mastroiacovo P, Addis A. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet* 2006;367:2057.
27. <http://www.eurocat-network.eu/> (accesso 29/10/2015).
28. Leoncini E, Botto LD, Cocchi G, et al. How valid are the rates of Down syndrome internationally? Findings from the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. *Am J Med Genet A* 2010;152A:1670-80.
29. Cordero AM, Crider KS, Rogers LM, Cannon MJ, Berry RJ. Optimal serum and red blood cell folate concentrations in women of reproductive age for prevention of neural tube defects: World Health Organization guidelines. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015;64:421-3.
30. [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/indicators\\_serum\\_RBC\\_folate/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/indicators_serum_RBC_folate/en/) (accesso 12/11/2105).
31. Zappacosta B, Persichilli S, Iacoviello L, et al. Folate, vitamin B12 and homocysteine status in an Italian blood donor population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23:473-80.

32. Owen WE, Roberts WL. Comparison of five automated serum and whole blood folate assays. *Am J Clin Pathol* 2003;120:121-6.
33. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, et al. Biomarkers of folate status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011;94:303S-312S.
34. Pfeiffer CM, Hughes JP, Lacher DA, et al. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre- to postfortification using assay-adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr* 2012;142:886-93.
35. Tinker SC, Hamner HC, Qi YP, Crider KS. U.S. women of childbearing age who are at possible increased risk of a neural tube defect-affected pregnancy due to suboptimal red blood cell folate concentrations, National Health and Nutrition Examination Survey 2007 to 2012. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2015;103:517-26.
36. Norsworthy B, Skeaff CM, Adank C, Green TJ. Effects of once-a-week or daily folic acid supplementation on red blood cell folate concentrations in women. *Eur J Clin Nutr*. 2004 Mar;58(3):548-54. PubMed PMID: 14985695.
37. Hao L, Yang QH, Li Z, Bailey LB, Zhu JH, Hu DJ, Zhang BL, Erickson JD, Zhang L, Gindler J, Li S, Berry RJ. Folate status and homocysteine response to folic acid doses and withdrawal among young Chinese women in a large-scale randomized double-blind trial. *Am J Clin Nutr*. 2008 Aug;88(2):448-57. PubMed PMID: 18689382.
38. Pietrzik K, Lamers Y, Brämswig S, Prinz-Langenohl R. Calculation of red blood cell folate steady state conditions and elimination kinetics after daily supplementation with various folate forms and doses in women of childbearing age. *Am J Clin Nutr*. 2007 Nov;86(5):1414-9. PubMed PMID: 17991654.
39. Hursthouse NA, Gray AR, Miller JC, Rose MC, Houghton LA. Folate status of reproductive age women and neural tube defect risk: the effect of long-term folic acid supplementation at doses of 140 µg and 400 µg per day. *Nutrients*. 2011 Jan;3(1):49-62. doi: 10.3390/nu3010049. Epub 2011 Jan 10. PubMed PMID: 22254076; PubMed Central PMCID: PMC3257734.
40. Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet*. 1996 Mar 9;347(9002):657-9. PubMed PMID: 8596381.
41. Houghton LA, Gray AR, Rose MC, Miller JC, Hursthouse NA, Gregory JF 3rd. Long-term effect of low-dose folic acid intake: potential effect of mandatory fortification on the prevention of neural tube defects. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jul;94(1):136-41. doi: 10.3945/ajcn.110.004549. Epub 2011 May 18. PubMed PMID: 21593499; PubMed Central PMCID: PMC3738376.
42. Daly S, Mills JL, Molloy AM, Conley M, McPartlin J, Lee YJ, Young PB, Kirke PN, Weir DG, Scott JM. Low-dose folic acid lowers plasma homocysteine levels in women of child-bearing age. *QJM*. 2002 Nov;95(11):733-40. PubMed PMID: 12391385.
43. Morin P, Payette H, Moos MK, St-Cyr-Tribble D, Niyonsenga T, De Wals P. Measuring the intensity of pregnancy planning effort. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2003;17:97-105.

44. Colapinto CK, O'Connor DL, Sampson M, Williams B, Tremblay MS. Systematic review of adverse health outcomes associated with high serum or red blood cell folate concentrations. *J Public Health* 2015;Jul 9. pii: fdv087. [Epub ahead of print].
45. Feng Y, Wang S, Chen R, Tong X, Wu Z, Mo X. Maternal folic acid supplementation and the risk of congenital heart defects in offspring: a meta-analysis of epidemiological observational studies. *Sci Rep* 2015;5:8506.
46. Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol* 2008;37:1041-58.
47. Surén P, Roth C, Bresnahan M, et al. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *JAMA* 2013;309:570-7.
48. Berry RJ, Crider KS, Yeargin-Allsopp M. Periconceptional folic acid and risk of autism spectrum disorders. *JAMA* 2013;309:611-3.
49. Hodgetts VA, Morris RK, Francis A, Gardosi J, Ismail KM. Effectiveness of folic acid supplementation in pregnancy on reducing the risk of small-for-gestational age neonates: a population study, systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2015;122:478-90.
50. Liu X, Lv L, Zhang H, et al. Folic acid supplementation, dietary folate intake and risk of preterm birth in China. *Eur J Nutr* 2015; Jul 3. [Epub ahead of print].
51. Bukowski R, Malone FD, Porter FT, et al. Preconceptional folate supplementation and the risk of spontaneous preterm birth: a cohort study. *PLoS Med* 2009;6:e1000061.
52. Corchia C, Mastroiacovo P. Health promotion for children, mothers and families: here's why we should "think about it before conception". *Ital J Pediatr* 2013;39:68.