

# Resultados del Programa de Prevención de Defectos de Tubo Neural en Chile mediante la fortificación de la harina con ácido fólico. Período 2001-2010

JULIO NAZER H.<sup>1</sup>, LUCÍA CIFUENTES O.<sup>2</sup>

## Effects of wheat flour fortification with folic acid on the prevalence of neural tube defects in Chile

**Background:** Congenital malformations (CMF) have an important role in infant mortality. Neural tube defects (NTD) have great relevance from both social and public health points of view. The ECLAMC (Collaborative Latin American Study of Congenital Malformations) maintains in Chile an epidemiological surveillance of CMF prevalence rate at birth since 1969. **Aim:** To assess the effect of wheat flour folic acid fortification on the prevalence of NTD. **Patients and Methods:** Only Anencephaly, Spina bifida and Cephalocele were considered as NTD. All children born in the maternities incorporated to ECLAMC between 1969 and 1999 were considered as belonging to the pre folic acid fortification period and those who were born from 2001 to 2010 were considered as belonging to the post fortification period. **Results:** The NTD prevalence rate at birth in the pre fortification period was 17.03/10,000. In the second period, there were 291,996 births and among them, 280 newborns were affected by a form of NTD (9.59 in 10,000 births). This represents a 44% decrease ( $p < 0.01$ ). Anencephaly rate fell from 7.16/10,000 to 3.67/10,000, representing a 49% lower rate ( $p < 0.01$ ). Spina bifida rate decreased from 8.61/10,000 to 4.49/10,000, representing a 48% lower rate ( $p < 0.01$ ). Cephalocele had a 20% non-significant reduction. **Conclusions:** Wheat flour fortification with folic acid reduced by 44% the prevalence rate of NTD at birth. This means that NTDs were prevented in 185 Chilean newborns each year.

(Rev Med Chile 2013; 141: 751-757).

**Key words:** Folic acid; Neural tube defects; Newborns.

Las anomalías congénitas tienen un rol importante dentro de las causas de mortalidad infantil. En Latinoamérica existe desde 1967 un programa de vigilancia epidemiológica de estas patologías al que Chile ingresó en 1969: el ECLAMC (Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas) cuyo objetivo principal es la de monitorizar las frecuencias de las malformaciones congénitas (MFC) con el fin de pesquisar variaciones de dichas frecuencias y poder hacer prevención primaria de ellas<sup>1</sup>. Partici-

pan 114 maternidades distribuidas en 10 países de Sudamérica<sup>2</sup>. El ECLAMC es, a su vez, miembro del Internacional Clearinghouse for Birth Defects Monitoring System (ICBDMS, 1991).

A principios de la década 1990-99 se demostró con trabajos de distribución aleatoria, que el uso de multivitamínicos que contuvieran ácido fólico (AF), reducían significativamente el riesgo de tener hijos afectados con defectos de cierre del tubo neural (DTN)<sup>3-5</sup>.

En la actualidad está demostrado que la admi-

<sup>1</sup>Unidad de Neonatología, Maternidad Hospital Clínico Universidad de Chile.

<sup>2</sup>Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Recibido el 25 de abril de 2012, aceptado el 17 de enero de 2013.

Correspondencia a:  
Dr. Julio Nazer Herrera  
Santos Dumont 999,  
Santiago de Chile.  
E-mail: jnazer@  
redclinicauchile.cl

nistración periconcepcional de 0,4 mg (400 ug) diarios de AF puede prevenir la ocurrencia de 50% de los DTN y hasta 70% de las recurrencias si se administra dosis 10 veces mayor, 4 mg diarios<sup>6,7</sup>. El cierre del tubo neural se completa a los 28 días de gestación y la mayoría de las mujeres embarazadas consultan después de pasada esa fecha. Por ello algunos países como Estados Unidos de Norteamérica (USA) a partir de 1998 recomiendan la fortificación con AF de los alimentos de consumo masivo como harinas y cereales<sup>8</sup>.

La tasa de prevalencia al nacimiento de los DTN en las maternidades chilenas participantes del ECLAMC en el período 1982-1999 fue de 17,03 por 10.000 nacimientos<sup>10</sup>, superior a la del resto del ECLAMC que fue de 14,88 por 10.000.

En Chile la harina de trigo, que es una de las principales fuentes de la alimentación, está siendo fortificada con AF, desde enero del año 2000, por disposición del Ministerio de Salud, con 220 ug de ácido fólico por cada 100 g de harina, asegurando un aporte de alrededor de 400 ug per cápita<sup>11</sup>. La harina fortificada empezó a ser consumida por la población 4 a 6 meses después (una vez acabado los stocks de harina no fortificada de los molinos), por lo que se esperaba que los RN cuyas madres recibieron los alimentos fortificados, empezaran a nacer en los primeros días del año 2001<sup>12</sup>.

Estudios preliminares realizados por el ECLAMC a 20 meses de iniciado el programa de fortificación<sup>13</sup> mostraron una reducción significativa de las tasas de prevalencia al nacimiento de los DTN en Chile.

Sin embargo, para poder atribuir a la acción del AF la causa real de esta reducción, es necesario conocer cual era la tendencia histórica de estas tasas, tanto en nuestro país como en el resto del mundo. Estudios de tendencia en Europa, EURO-CAT Workin Group<sup>14,15</sup> y USA<sup>16</sup> mostraban una tendencia a disminuir las tasas.

Es necesario, además, tener en cuenta que el ECLAMC es un estudio de base hospitalaria, donde los hospitales están continuamente entrando al sistema de vigilancia, permanecen activos algunos años y luego se retiran en diferentes períodos. Son pocos los que permanecen por largo tiempo. El Hospital Clínico de la Universidad de Chile es el único que ha colaborado en forma ininterrumpida desde su ingreso hasta la fecha. Ello puede, al analizar largos períodos, alterar los resultados y por ende modificar la tendencia.

Para verificar si en Chile una tendencia preexistente a la disminución de las tasas pudiera influir sobre el resultado real de la acción del ácido fólico, estudiamos las tasas de prevalencia al nacimiento de una serie de 31 años previos a la fortificación y la comparamos con los datos actuales.

## Pacientes y Método

El ECLAMC fue creado, como dijimos, en 1997. En él participan 114 maternidades de 10 países Sudamericanos<sup>2</sup>, entre ellos Chile desde 1969. La lista de los hospitales chilenos participantes de este estudio se muestra en la Tabla 1.

Ingresan al registro todos los recién nacidos (RN) vivos o mortinatos, cuyo peso de nacimiento sea de 500 g o más. Se consideró DTN a todos casos de anencefalia, espina bífida y meningocele vivos o mortinatos, tanto aislados como asociados a otras anomalías. Ellos fueron definidos de acuerdo a las normas del ICBDMs (1991).

El objetivo de este trabajo es conocer la magnitud de la disminución de las tasas de prevalencia al nacimiento de los DTN: anencefalia, espina bífida y cefalocele en Chile, al cumplirse 10 años de la implementación del programa de fortificación de la harina con AF.

Para poder evaluar los resultados, se consideró como período pre fortificación a los nacimientos ocurridos antes del año 2000 y como post-fortificación los nacidos a partir del año 2001. El año 2000 fue considerado como un año de transición, ya que la harina fortificada comenzó a llegar a la población en marzo o abril de ese año y los niños concebidos dentro del programa comenzaron a nacer seguramente a comienzos del 2001. Para este trabajo se consideró como el período prefortificación la muestra publicada de los años 1982 a 1999<sup>10</sup>. Como período post-fortificación el período 2001-2010.

Se revisó la base de datos que el ECLAMC dispone en las maternidades chilenas participantes en el proyecto. Ingresaron a la muestra todos los RN vivos y mortinatos de 500 g o más, que nacieron entre enero de 2001 y diciembre de 2010. Se comparó las tasas entre los períodos pre y post fortificación, mediante prueba de  $\chi^2$ . Se estudió la tendencia de las tasas a través del test no paramétrico de tendencia desarrollado por Cusik<sup>17</sup>.

## Resultados

En el período estudiado ocurrieron 291.996 nacimientos consecutivos en los hospitales chilenos participantes (Tabla 1). De ellos 289.850 fueron recién nacidos vivos (RNV) y 20.146 mortinatos (RNM), lo que representa una mortinatalidad o mortalidad fetal tardía de (0,73%).

En la muestra se encontró 280 pacientes portadores de algún DTN (9,63 por 10.000 nacimientos). De ellos 239 (85,4%) eran RNV y 41 (14,6%) RNM. La tasa de prevalencia de DTN en NV fue 9,7 por 10.000 (280/289.850) y de 1,9% (41/2.146) en mortinatos.

Al comparar las tasas del período pre fortificación (1969-1999) con el período post fortificación (2001-2010) (Tabla 2), podemos observar una reducción significativa del Total de DTN de 17,03 a 9,58 ( $\chi^2 = 63,55$ ), lo que representa una disminución de 43,71%. Si desglosamos por diagnósticos vemos que anencefalia cayó de 7,15 por 10.000 a 3,66 por 10.000 ( $\chi^2 = 35,33$ ), lo que representa una disminución de 48,81%. Espina bífida, por su parte bajó de 8,60 por 10.000 a 4,48 por 10.000 ( $\chi^2 = 47,67$ ) lo que representa una disminución de 47,9%. Cefalocele disminuyó 20,10%, pero no alcanzó significancia ( $\chi^2 = 1,57$ ,  $p < 0,05$ ) (Tabla 2). El total de casos de RN con DTN es inferior a la suma de los casos de anencefalia, espina bífida y cefalocele, pues algunos RN presentaban simultáneamente dos de estas malformaciones.

La evolución de esta disminución de las tasas de prevalencia del total y de cada una de las anomalías se muestra en la Tabla 3. Podemos observar que ella no es homogénea, ya que a una caída significativa los años 2002 y 2003 le sigue una alza brusca en el 2004 y a partir de ahí tomar una tendencia a disminuir hasta el año 2009.

La evolución de la tasa total de DTN a lo largo de los años se aprecia en la Tabla 4, en ella se observa que las tasas descienden después del año 2000. La gráfica de estas tasas que se expone en la Figura 1, demuestra una curva que no se ajusta a ningún modelo no lineal y tampoco demuestra periodicidades estadísticamente significativas. Se puede apreciar una diferente tendencia entre el año 1982 y 1999 (ascendente) y el período comprendido entre los años 2001 y 2010 en que la tendencia es descendente. En el período 1982-1999 el test de Cuzick demuestra una tendencia al aumento que

**Tabla 1. Hospitales chilenos participantes en el ECLAMC en el período 2001-2010**

Hospital Clínico de la Universidad de Chile
Hospital Regional de Valdivia
Hospital Las Higueras de Talcahuano
Hospital Naval de Valparaíso
Sanatorio Alemán de Concepción
Hospital Regional de Rancagua
Dr. E. Torres de Iquique
Hospital Base de Linares
Hospital Base de Puerto Montt
Hospital Sótero del Río
Hospital del Salvador
Hospital San Borja-Arriarán
Hospital San José
Hospital de Talca
Hospital de Cauquenes
Hospital de Curicó

**Tabla 2. Comparación entre las tasas de Defectos del Tubo Neural del período 1969-1999 y las del período 2001-2010 en hospitales chilenos miembros del ECLAMC. Tasa por 10.000 nacimientos**

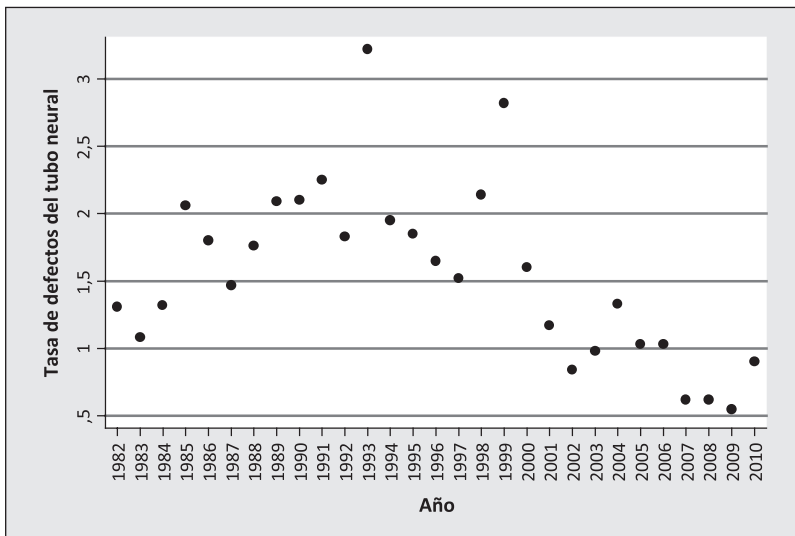
	1969-1999	Tasa	2001-2010	Tasa	Disminución	$\chi^2$
Total nacimientos	434.624		291.996			
Total DTN	740	17,02	280	9,58	43,71	68,91*
Anencefalia	311	7,15	107	3,66	48,81	37,03*
Espina bífida	374	8,60	131	4,48	47,91	42,46*
Cefalocele	91	2,09	49	1,67	20,10	1,57 n.s.

\* $p < 0,0000001$ . n.s. No significativo.

**Tabla 3. Evolución de las tasas por año de anencefalia, espina bífida, cefalocele y total de DTN durante el período 2001-2010 en los hospitales chilenos del ECLAMC. Tasas por 10.000 nacimientos\***

Año	Total RN	Anencef	Tasa	Esp bifid.	Tasa	Cefalocele	Tasa	Total DTN	Tasa
2001	58.893	24	4,1	34	5,8	13	2,2	69	11,72
2002	51.355	14	2,7	21	4,1	8	1,6	43	8,37
2003	31.682	13	4,1	16	5,1	2	0,6	31	9,78
2004	29.266	19	6,5	14	4,8	6	2,1	39	13,33
2005	27.251	10	3,7	13	4,8	9	3,3	28	10,28
2006	20.412	8	4,0	10	4,9	4	2,0	21	10,29
2007	19.280	3	1,6	6	3,1	3	1,6	12	6,22
2008	20.715	6	2,9	6	2,9	1	0,5	13	6,28
2009	16.252	3	1,9	4	2,5	2	1,2	9	5,54
2010	16.718	7	4,9	7	4,2	1	0,6	15	8,97
Total	291.996	107	3,7	131	4,5	49	1,7	280	9,58

\*El total de casos de RN con DTN es inferior a la suma de los casos de anencefalia, espina bífida y cefalocele, pues algunos RN presentaban simultáneamente dos de estas malformaciones.

**Figura 1.** Tasa de defectos tubo neural 1982-2010.

es significativa ( $p = 0,023$ ) y en el período 2000 y 2010 este test demuestra una tendencia significativa (descenso) en la tasa de defectos del tubo neural entre los años ( $p = 0,027$ ).

## Discusión

Si estudiamos la tendencia secular de las tasas de prevalencia al nacimiento de los DTN en

Chile en los años previos a la implementación del programa de fortificación de la harina con AF (1967-1999), podemos comprobar que no existía una tendencia a disminuir, si no al contrario a aumentar<sup>10</sup>, como se aprecia en la Figura 1.

La tasa para ese período era de 17,03 por 10.000 nacimientos, significativamente mayor que en el resto del ECLAMC (14,88 por 10.000). La reducción de la tasa de prevalencia de 17,03 en el primer período a 9,6 por 10.000 nacimientos en

**Tabla 4. Evolución de las tasas de Defectos de Tubo Neural del período 1969-2010 en hospitales chilenos miembros del ECLAMC. Tasa por 1.000 nacimientos**

Año	Tasa
1982	1,31
1983	1,08
1984	1,32
1985	2,06
1986	1,8
1987	1,47
1988	1,76
1989	2,09
1990	2,1
1991	2,25
1992	1,83
1993	3,22
1994	1,95
1995	1,85
1996	1,65
1997	1,52
1998	2,14
1999	2,82
2000	1,6
2001	1,17
2002	0,84
2003	0,98
2004	1,33
2005	1,03
2006	1,03
2007	0,62
2008	0,62
2009	0,55
2010	0,9

la actualidad es estadísticamente significativa ( $\chi^2$  63,55) y corresponde a una reducción de 42,47%.

Esto demuestra que el Programa de fortificación de la harina de trigo con AF implementada por el Ministerio de Salud de Chile ha tenido un resultado exitoso. La disminución de la tasa de prevalencia al nacimiento de los DTN es muy importante desde el punto de vista tanto de salud pública como económico-social. Ello significa que antes del año 2001 con una tasa de 17,03 por 10.000

nacimientos, nacían en Chile 425 niños afectados al año, mientras que en la actualidad con una tasa de 9,58 por 10.000 nacen sólo 240 niños afectados. Se ha logrado evitar que 185 recién nacidos por año presenten esta patología. La anencefalia que es un defecto congénito incompatible con la vida se redujo en casi 50%, colaborando a la reducción de la mortalidad infantil en forma importante. Lo mismo espina bífida que disminuyó 47,91%. Se sabe que cerca de 90% de los niños con espina bífida, si no fallecen en los primeros años, terminan sus vidas en silla de ruedas. La disminución de su prevalencia en casi 50% constituye un alivio significativo, tanto para la sociedad como para los servicios de salud. La disminución de ambas patologías es estadísticamente significativa, no así cefalocele.

Otro hecho que se demuestra en este trabajo es que las variaciones de las tasas a lo largo de los 10 años han sido muy irregulares, incluso en el año 2004 aumentó por sobre la línea base del año 2001. Luego desde el 2006 se han estabilizado, pero siempre con una leve tendencia a disminuir. Esto sugiere que la carencia de folatos no es el único factor que contribuye a la aparición de estas anomalías y, por lo tanto, es necesario seguir investigando el tema para encontrar otros factores que ayuden a la prevención primaria de ellos.

Si analizamos lo que ha ocurrido en los países de Sudamérica donde se ha implementado programas de fortificación de la dieta con AF, Chile, Argentina y Brasil, podemos observar a través de la literatura médica publicada, la disminución de la frecuencia de los DTN. Castilla y cols<sup>13</sup> en el 2003, en una comunicación preliminar, a 20 meses de iniciado el programa en Chile, comunica una reducción de 31% de los DTN. En un segundo trabajo, con datos definitivos, López-Camelo y cols. (2005)<sup>12</sup>, mostró una reducción de 51% para espina bífida, con una caída de la tasa desde 9,3 casos por 10.000 nacimientos antes de la fortificación a 4,8 por 10.000 nacimientos después de la fortificación. Una reducción de 43% en anencefalia, (8,2/10.000 a 3,2/10.000 nacimientos). La reducción global de los DTN fue de 47%. En otro estudio reciente con datos del ECLAMC, López-Camelo<sup>18</sup> estudió la frecuencia de 52 defectos congénitos en Chile, Argentina y Brasil y concluye que la fortificación de los alimentos con AF previene los DTN, pero no otros tipos de anomalías congénitas.

Varios países sudamericanos están actualmente

fortificando la harina de trigo con AF. El primero en hacerlo fue Chile en el año 2000 agregando 2,2 mg/kg con lo que proveía 360 microgramos diarios por persona, que es una dosis aceptable para prevenir la ocurrencia de algunos casos de DTN. En el año 2003, 1 año después de iniciado el programa en Chile presentamos los datos preliminares en los cambios en la tasa de prevalencia después de la fortificación de la harina de trigo con AF<sup>13</sup>, detectados por el método CUSUM, aplicado desde 1999 a todos los países de Sudamérica participantes en el ECLAMC. Se encontró que sólo en Chile los tres tipos de anomalías congénitas de tubo neural, mostraban un descenso significativa (31%), durante los años 2000-2001 correspondientes al período de fortificación periconcepcional. Los niveles de significancia ( $p < 0,001$ ) se alcanzaron a los 20 meses después de iniciada la fortificación.

Simultáneamente, en Chile, Eva Hertrampf<sup>19</sup> comunica que en el período 2001-2002, en una muestra de 120.500 nacimientos, encontró 43% de reducción en la tasa de DTN. López-Camelo et al. 2005<sup>12</sup>, reportan un descenso de la tasa de prevalencia de espina bífida de 51% y de 42% en anencefalia en el período post fortificación en Chile.

López-Camelo et al 2010<sup>18</sup> revisan el impacto de la suplementación de la dieta con AF sobre 52 tipos de anomalías congénitas en tres países Sudamericanos con un total de más de 3,3 millones de nacimientos en el período 1982-2007, en Chile, Argentina y Brasil. Comparó los períodos pre y post fortificación y encontró una disminución significativa de la frecuencia de DTN. La máxima reducción de prevalencia se observó en espina bífida aislada, seguida de anencefalia y cefalocele. Sin embargo, estudiados los países por separado se vio que en los tres países hubo un descenso estadísticamente significativo de anencefalia y de espina bífida, pero sólo en Chile y Argentina hubo reducción significativa de las tasas de cefalocele. La reducción de espina bífida fue mayor en los casos aislados que asociados a otras malformaciones congénitas. Es importante destacar que ninguno de los otros 51 diagnósticos estudiados mostraron reducciones significativas.

Carol Bowers<sup>19</sup>, del registro australiano de defectos congénitos, observó en el período 1996-2006 en que existía ya el programa de fortificación con AF, una disminución de 32% en la tasa de prevalencia de anencefalia, 23% en espina bífida y 34% en cefalocele.

En Canadá, De Wals y cols.<sup>20</sup>, en una muestra de 1,9 millones de nacimientos, durante el período de fortificación, encontraron una disminución de 46% en la tasa de prevalencia de DTN. Esta disminución fue mayor para espina bífida, 53%, que para anencefalia, 38%, y cefalocele, 31%.

## Conclusión

El programa de prevención primaria de los DTN en Chile mediante la fortificación de la harina de trigo con AF ha logrado en 10 años rebajar la tasa de prevalencia de ellos de 17,02 por 10.000 nacimientos a 9,58 por 10.000 nacimientos, es decir, 43,71% de reducción. La tasa de anencefalia se redujo de 7,15/10.000 a 3,66/10.000, reducción de 48,81% ( $\chi^2 35,33$ ). Espina bífida cayó de 8,60/10.000 a 4,48/10.000, 47,91% de reducción ( $\chi^2 1,57$ ). Cefalocele disminuyó 20,10%, no significativo. Esto significa haber evitado que 185 niños al año nacieran con alguna de estas anomalías.

## Referencias

1. Castilla EE, Orioli IM. Epidemiology in neural tube defects in South America. *Am J Med Genet* 1985; 22 (4): 695-702.
2. Castilla EE, Orioli MI. ECLAMC: The Latin-American Collaborative Study of Congenital Malformations. *Community Genet* 2004; 7 (2-3): 76-94.
3. MRC Vitamin Study Research Group: Prevention of Neural Tube Defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 131-5.
4. CDC. Use of folic acid for prevention of spina bífida and other tube defects, 1983-1991. *MMWR* 1991; 40: 513-5.
5. Czeizel AE, Duddas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832-5.
6. U.S. Public Health Service: Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bífida and other tube defects. *MMWR* 1992; 41: 1-7.
7. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects in California. *Epidemiology* 2005; 6: 219-26.
8. Botto LD, Moore CA, Koury MJ, Erickson JD. Neural tube defects. *N Engl J Med* 1999; 341: 1509-19.
9. Acuña J, Yoon P, Erikson J. La prevención de los defectos de tubo neural con ácido fólico. Estados Unidos. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Centro

- para la prevención y el control de Enfermedades (CDC) 1999; 1-13.
10. Nazer J, López-Camelo J, Castilla E. Estudio de 30 años de vigilancia epidemiológica de defectos de tubo neural en Chile y en Latinoamérica. *Rev Med Chile* 2001; 129: 531-9.
  11. Hertrampf E, Cortés F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, et al. Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr* 2003; 133: 3166-9.
  12. López-Camelo JS, Orioli IM, Dutra MG, Nazer-Herrera J, Rivera N, Ojeda ME, et al. Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. 2005; *Am J Med Genet* 135A: 120-5.
  13. Castilla EE, Orioli IM, López-Camelo J, Dutra MG, Nazer-Herrera J. Preliminary data on changes in Neural Tube Defects Prevalence rates after folic acid Fortification in South America. 2003; *Am J Med Genet* 123A: 123-8.
  14. EUROCAT Working Group. Prevalence of neural tube defects in 20 regions of Europe and the impact of prenatal diagnosis, 1980-1986. *J Epidemiol Commun Health* 1991; 45: 52-8.
  15. Eurocat Folic acid Working Group. Preventing neural tube defects in Europe: Population based study. *BMJ* 2005; 330: 574.
  16. Elwood JM, Elwood JH. 1980. *Epidemiology of anencephalus and spina bifida*. Oxford: Oxford University Press.
  17. Cuzick J. Wilcoxon prueba tipo para tendencia *Stat. Med* 1985; 4 (1): 87-90.
  18. López-Camelo J, Castilla E, Orioli IM. Folic acid flour fortification: Impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Of Med Genet* 2010; 152 A: 2444-58.
  19. Bower C, D'Antoine H, Stanley FJ. Neural tube defects in Australia: trends in encephalocoeles and other neural tube defects before and after promotion of folic acid supplementation and voluntary food fortification. *Birth Defects Res A Clin Mol Tritol* 2009; 85: 269-73.
  20. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, Lowry RB, Sibbad B, Evans JA, et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med* 2007; 357: 135-42.