



Nederlandse Voedsel- en
Warenautoriteit
Ministerie van Economische Zaken,
Landbouw en Innovatie

**Bureau Risicobeoordeling &
onderzoeksprogrammering**

Catharijnesingel 59
3511 GG Utrecht
Postbus 43006
3540 AA Utrecht
www.vwa.nl

nota

Advies van de directeur bureau Risicobeoordeling en
onderzoeksprogrammering (BuRO) over de
risicobeoordeling van het artikel Séralini et al. (2012)

Datum
01 oktober 2012

ADVIES

Wetenschappelijke risicobeoordeling van de publicatie van Séralini en coauteurs over gezondheidsrisico's voor mens en dier na vervoederen van Roundup-tolerante GM- maïs en Roundup herbicide aan ratten

Achtergrond

Op 19 september 2012 heeft het wetenschappelijk tijdschrift Food and Chemical Toxicology een artikel openbaar gemaakt van Séralini en coauteurs over de mogelijke schadelijke effecten van een bepaalde variant van genetisch gemodificeerde maïs (NK603) en het herbicide Roundup (waarvan het hoofdbestanddeel glyfosaat is). Gezien de aard van de gerapporteerde effecten in een tweejarige rattenstudie met deze producten hebben verschillende voedselveiligheidsautoriteiten in Europa een evaluatie van de studie voorgenomen. De Europese Commissie heeft op 26 september 2012 het Europese Voedselveiligheidsagentschap EFSA (European Food Safety Authority) verzocht om een EFSA-oordeel van deze studie. Tevens heeft de Europese Commissie aan de EFSA gevraagd of de studie nieuwe wetenschappelijke inzichten bevat die aanleiding geven om de eerdere EFSA-beoordeling inzake GM-maïs (NK603) te hierzien. De EFSA heeft al op 19 september 2012 alle lidstaten van de EU benaderd en een wetenschappelijke risicobeoordeling van de studie aangekondigd gericht op de mogelijke consequenties van de uitkomsten van de studie voor de voedselveiligheid van genetisch gemodificeerde gewassen en de herbiciden op basis van glyfosaat. In de publicatie¹ schrijven de auteurs dat een levenslange blootstelling aan een Roundup-tolerante genetisch gemodificeerde (GM) maïs en het

¹ Séralini, G-E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D., Spiroux de Vendômois, J. (2012) Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. Food and Chemical Toxicology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.005>



onkruidbestrijdingsmiddel Roundup ernstige en letale ziekteverschijnselen veroorzaakt in de rat. De genetische modificatie zorgt ervoor dat de maïs bestand is tegen behandeling met de herbicide Roundup en is toegelaten voor import in de Europese Unie (Verordening 258/97). De mogelijke belangrijke risico's voor de volks- en diergezondheid waren voor de Ministeries van EL&I en VWS en het bureau Risicobeoordeling en onderzoeksprogrammering (BuRO) van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) reden om op de korte termijn een oordeel te vormen over de wetenschappelijke kwaliteit van het Franse onderzoek. Dit oordeel is vooruitlopend op en ondersteunend aan het oordeel van EFSA. De nadruk van de wetenschappelijke risicobeoordeling door NVWA-BuRO ligt op de validiteit van de conclusies en de eventuele consequenties voor de gezondheid van mens en dier.

Ondernomen acties

Direct na het openbaar maken van het artikel van Séralini en coauteurs heeft NVWA-BuRO op basis van de toen beschikbare informatie een eerste voorlopige inschatting gemaakt van de wetenschappelijke kwaliteit van het artikel en de eventuele gevolgen voor de huidige veiligheidsbeoordeling van genetisch gemodificeerde voedsel- en voedergewassen en herbiciden met de werkzame stof glyfosaat.

Op 24 september 2012 hebben de Ministeries van EL&I en VWS en NVWA-BuRO een wetenschappelijke beoordeling van het artikel gevraagd aan het frontoffice Voedselveiligheid van RIVM en RIKILT op basis van het eerste voorlopige oordeel van NVWA-BuRO. Hiertoe zijn een aantal verdiepende vragen voorgelegd. Op 27 september is van het frontoffice een eerste conceptantwoord ontvangen, en een definitief antwoord is op 1 oktober ontvangen.

Op 26 september 2012 heeft de directeur van NVWA-BuRO zijn eerste wetenschappelijke risicobeoordeling van de kwaliteit van het artikel van Séralini en coauteurs besproken in de vergadering van het EFSA Adviesforum in Parma.

Voor gedachtenwisseling en afstemming heeft NVWA-BuRO op 28 september 2012 deelgenomen aan de teleconferentie tussen vertegenwoordigers van EFSA en Europese lidstaten. In het bijzonder in Duitsland, Frankrijk en België zijn ook (voorlopige) risicobeoordelingen van de studie van Séralini en coauteurs uitgevoerd. Duitsland heeft getracht nadere informatie van de onderzoekers te verkrijgen (ruwe data, logboeken). De onderzoeksgroep van Séralini heeft echter niet gereageerd op dit verzoek. Frankrijk heeft aan de leverancier van de geteste ratten, Harlan, informatie over de rattensoort opgevraagd. Op 1 oktober 2012 is deze laatste informatie van het HCB (Haut Conseil des Biotechnologies) uit Frankrijk ontvangen.



De wetenschappelijke risicobeoordeling van RIVM en RIKILT en de informatie-uitwisseling met Europese lidstaten vormde de basis voor het definitieve advies van de directeur BuRO van de NVWA.

De evaluatie

NVWA-BuRO heeft aan het frontoffice RIVM-RIKILT Voedselveiligheid gevraagd de wetenschappelijke kwaliteit van het artikel te beoordelen. Hierbij gaat het ondermeer om proefopzet, uitvoering, interpretatie van resultaten, kwaliteit van de gebruikte proefdieren en statistiek. Ook is gevraagd een inschatting te maken van mogelijke consequenties voor de huidige methodiek van beoordeling van genetisch gemodificeerde gewassen en glyfosaathoudende gewasbeschermingsmiddelen om de gezondheidsrisico's voor mens en dier te kunnen schatten, waaronder de toepassing van de zogenoemde 90-dagen voederstudie. RIVM en RIKILT hebben tevens de eerste conclusies van de BuRO-risicobeoordeling van de Franse studie onderworpen aan een review (bijlage 1: Front Office beoordeling studie Seralini et al_definitief). Daarnaast heeft NVWA-BuRO de beschikbare wetenschappelijke literatuur verkend over het testen van mogelijke schadelijke effecten voor mens en dier van de blootstelling aan GM-gewassen en het reguliere carcinogenteitsonderzoek in het algemeen.

Conclusies

Naar aanleiding van de wetenschappelijke risicobeoordeling van de studie van Seralini en coauteurs (2012) concludeert NVWA-BuRO dat de Franse onderzoekers verbanden leggen tussen behandeling en effecten die niet wetenschappelijk onderbouwd zijn.

In het bijzonder geldt het volgende.

- Door de gebruikte rattensoort in combinatie met de te kleine onderzoekspopulatie, geen vergelijking met een actuele of eigen databank van historische controlegroepgegevens (HCD) van de rattensoort en het ontbreken van een statistische analyse is er een grote kans dat de Franse onderzoekers een verkeerd beeld van de resultaten van de tweejarige voederproef in de rat hebben gegeven. Door de grotere kans op spontane kankers en tumoren en overige gezondheidsproblemen na twee jaar blootstelling kunnen de waargenomen verschillen tussen controle en behandelde groepen berusten op toeval, een risico dat toeneemt als de onderzoeksgroep niet groter is dan tien proefdieren (bijlage 1);
- De verhouding GM-maïs (NK603)/standaard knaagdiervoeder was niet gelijk in alle behandelde diergroepen. Het kan ook betekenen dat de gezondheidseffecten werden veroorzaakt door deze verschillen in de diëten en niet door de GM-maïs (NK603) of het herbicide glyfosaat.



- De fracties dieren met kankers nemen niet duidelijk toe met toenemende doses van GM-maïs (NK603) of glyfosaat. De auteurs geven aan dat sprake is van een 'threshold response' opgewekt door een invloed op de hormoonhuishouding. Dit is wetenschappelijk geen zinnige conclusie, omdat drempels met 10 dieren per dosisgroep volledig buiten het statistisch waarneembare gebied liggen.
- Van de stof glyfosaat, de actieve component in Roundup, of metabolieten ervan in gewassen, is niet eerder aangetoond dat deze kankerverwekkend is.
- Het onderzoek is qua opzet, uitvoering en rapportage ongeschikt om een uitspraak te kunnen doen over de veronderstelde niet-dosisgerelateerde hormoonontregeling door blootstelling aan de GM-maïs (NK603) of de stof glyfosaat. Een dergelijke conclusie vraagt om veel meer proefdieren en een goede statistische analyse.
- De biochemische veranderingen tussen behandelde groepen en controlegroep zijn niet te verifiëren: onderliggende data zijn niet gepubliceerd en de statistische methode (two class discriminant analyse) voor de data-analyse is erop gericht verschillen te vinden in plaats van te onderzoeken of er verschillen tussen onderzoeksgroep en controlegroep aangetoond kunnen worden.

Uit de nabeschuiving van de teleconferentie met EFSA en de lidstaten België, Duitsland en Frankrijk wordt geconcludeerd dat de conclusies van hun voorlopige risicobeoordelingen geheel in lijn zijn met de Nederlandse bevindingen (bijlage 2: TC minutes 28092012_1stMTG final).

Advies NVWA-BuRO

Gelet op de slechte wetenschappelijke kwaliteit van het artikel, zoals beoordeeld wordt door BuRO, het frontoffice RIVM-RIKILT, BfR in Duitsland, ANSES en HCB in Frankrijk, EFSA in Italië en het WIV-ISP in België adviseer ik om de huidige methodiek van de voedsel- en voederveiligheidsbeoordeling van GM-gewassen (guidance EFSA^{a,b,c}, 2011) en de herbicide glyfosaat (EFSA^{a,b}, 2009) niet te wijzigen. Verder adviseer ik u het oordeel van EFSA af te wachten die naar verwachting in oktober 2012 nog zal verschijnen.

Voor de verdere uitleg en onderbouwing van mijn wetenschappelijke risicobeoordeling van de studie verwijs ik naar deel 2 van mijn advies met de bijlagen 1 en 2.

Wat er verder nog gaat gebeuren

EFSA heeft aangekondigd begin oktober 2012 een eerste concept EFSA-oordeel naar buiten te brengen.
EFSA heeft aangekondigd eind oktober 2012 een definitief EFSA-oordeel van het artikel van Séralini en coauteurs naar buiten te brengen.



Bureau Risicobeoordeling &
onderzoeksprogrammering

Datum
1 oktober 2012

BuRO, zal evenals BfR uit Duitsland en ANSES uit Frankrijk, in oktober 2012 proberen nadere informatie van de onderzoekers te verkrijgen waarbij het gaat om ruwe gegevens van de studie, studieprotocollen en logboeken, qPCR-analyse van DNA monsters van GM-maïs (NK603), chemische samenstelling van de formuleringen GT Plus (glyfosaat) en WeatherMAX (glyfosaat), histopathologische gegevens van de individuele proefdieren, en chemische analyses van onder andere het diervoeder. Collega's van HCB uit Frankrijk hebben toegezegd begin oktober de informatie van de historische controlegegevens van de rattensoort (Harlan Sprague-Dawley) aan BuRO door te sturen. Op 1 oktober 2012 zijn deze gegevens ontvangen.

Mocht er aanleiding voor zijn, dan komt BuRO met een vervolgadvis over de wetenschappelijke risicobeoordeling van de studie van Séralini en coauteurs.



Deel 2

Onderbouwing van de beoordeling van de publicatie van Séralini en coauteurs over gezondheidsrisico's voor mens en dier na vervoederen van Roundup-tolerante GM-maïs en Roundup herbicide aan ratten

Achtergrond

Op 19 september 2012 publiceerde de EFSA (Europese Voedselautoriteit) een persbericht dat de Autoriteit de voorpublicatie van Séralini en medeauteurs in het wetenschappelijk tijdschrift Food and Chemical Toxicology met spoed zou bestuderen op consequenties voor de voedselveiligheid van genetisch gemodificeerde gewassen en glyfosaat. In de publicatie (Séralini et al. 2012) met als titel "Long term toxicity of a Roundup herbicide and Roundup-tolerant genetically modified maize" stellen Franse onderzoekers dat de dagelijkse blootstelling aan een Roundup-tolerante genetisch gemodificeerde (GM) maïs en het onkruidbestrijdingsmiddel Roundup na twee jaar ernstige en letale ziekteverschijnselen veroorzaakt in de rat. De genetische modificatie, overexpressie van het EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) transgen in NK603, zorgt ervoor dat de GM-maïs (NK603) bestand is tegen behandeling met de herbicide Roundup (de actieve stof is glyfosaat), dat is toegelaten voor import in de Europese Unie (Verordening EC 258/97 en Verordening EC 1829/2003²). De voorpublicatie heeft wereldwijd media-aandacht gekregen en ophef veroorzaakt met betrekking tot het onderzoek voor de bepaling van de voedselveiligheid van genetisch gemodificeerde gewassen en het testen van glyfosaatformuleringen op veiligheid voor mens, dier en milieu. Vooral het toepassen van de zogenoemde 90-dagen studie met het hele GM-gewas wordt in het artikel ernstig bekritiseerd (zie ook Séralini et al. 2011). Voor bureau Risicobeoordeling en onderzoeksprogrammering (BuRO) van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) was het persbericht van EFSA daarom aanleiding voor een risicobeoordeling van de wetenschappelijke kwaliteit van de Franse studie.

Vragen die gesteld zijn

Wat is het wetenschappelijk oordeel van het frontoffice RIVM-RIKILT Voedselveiligheid over het onderzoek van Séralini en coauteurs (2012)?

Daarbij zijn volgende subvragen van belang:

1. Zijn de argumenten van Séralini et al. om géén proefprotocol met een groepsgrootte van n=50 te gebruiken wetenschappelijk valide?

²EFSA Journal (2009) 1137, 1-50.



Citaat: "we had no reason to settle at first for a carcinogenesis protocol using 50 rats per group. However we have prolonged the biochemical and hematological measurements or disease status recommended in combined chronic studies using 10 rats per group (up to 12 months in OECD 453). This remains the highest number of rats regularly measured in a standard GMO diet study."

2. Vindt het frontoffice RIVM-RIKILT Voedselveiligheid de kritiek van Séralini et al. met betrekking tot de geadviseerde 90-dagen voederproef terecht en onderbouwd?
3. Is de stof glyfosaat en/of residuen kankerverwekkend?
4. Wat vindt het frontoffice RIVM-RIKILT Voedselveiligheid van de kwaliteit van de proefopzet en het rapporteren van resultaten, en de statistische analyse van eindpunten in relatie tot een gangbare toxicologische werkwijze?
5. Wat is het oordeel van RIVM en RIKILT over de verklaringen die onderzoekers geven ten aanzien van de oorzaak-effect relaties, zoals enerzijds een niet-lineaire hormoonontregeling door glyfosaat of anderzijds een niet-lineair effect door het transgen of metabole verstoringen in de maïs als gevolg van de insertie?

Opzet

NVWA-BuRO heeft aan het frontoffice RIVM-RIKILT Voedselveiligheid gevraagd de wetenschappelijke kwaliteit van het artikel van Séralini et al. (2012) te beoordelen en conclusies van de Franse onderzoekers nader te verifiëren. Daarnaast is door NVWA-BuRO de beschikbare wetenschappelijke literatuur verkend over het testen van mogelijke schadelijke effecten voor mens en dier van de blootstelling aan GM-gewassen. De gebruikelijke toxicologische werkwijze met betrekking tot carcinogeniteitsonderzoek zoals is voorgeschreven door diverse autoriteiten (o.a. OECD, EPA, NTP, EMA, ECHA) is ook nader bestudeerd.

Ook heeft NVWA-BuRO deelgenomen aan een Europa-brede uitwisseling van voorlopige conclusies van kritische oordelen van de verschenen studie van Séralini et al. (2012), en zijn de mogelijke consequenties voor de toelating van GM-maïs (NK603) en Roundup onderzocht. Daartoe heeft de EFSA een teleconferentie georganiseerd met lidstaten die al actief bezig zijn met deze kwestie (bijlage 2).

RIVM en RIKILT hebben vervolgens de eerste conclusies van het BuRO-onderzoek en een aantal verdiepende vragen onderworpen aan een risicobeoordeling (bijlage 1).



Op basis van de wetenschappelijke risicobeoordeling door het frontoffice RIVM-RIKILT Voedselveiligheid en de consultatie van EFSA en lidstaten is het advies van NVWA-BuRO afgerond.

De onderzoeksresultaten

De studie van Séralini en medeauteurs (2012) is gecompliceerd van opzet en volgt niet éénduidig de OECD richtlijnen voor proefdieronderzoek. In het algemeen is de studie onvolledig gepubliceerd. Er ontbreken in het artikel een veelvoud aan essentiële gegevens nodig voor een beoordeling van de resultaten en de op basis ervan getrokken conclusies (bijlagen 1 en 2). Zo is voor de teelt/veldproef van de GM-maïs (NK603) de glyfosaatformulering WeatherMAX (540 g/L glyfosaat) en voor de dierproef het middel GT Plus (450 g/L glyfosaat) gebruikt. Terecht stellen de auteurs vast dat dergelijke formuleringen adjuvants of overige actieve ingrediënten kunnen bevatten die niet zijn getoetst onder condities van een levenslange blootstelling aan proefdieren. De Franse onderzoekers verzuimen details over samenstelling te geven of aan te tonen dat beide formuleringen equivalent zijn.

Overige essentiële details die nodig zijn voor een goede risicobeoordeling van de Franse studie ontbreken, zoals bijvoorbeeld gegevens over analyseresultaten van de GM-maïs (NK603) en de controle maïs, de rattenvoerders, de voeder- en waterconsumptie, en over de groei en lichaamsgewichten van de ratten, en of de studie al dan niet geblindeerd was. Een statistische analyse van bijvoorbeeld consumptie, groei, mortaliteit, en kankerincidentie en multiplicitéit is niet uitgevoerd. En data over de uitgevoerde statistische analyse van de biochemische parameters ontbraken.

EFSA adviseert om een 90-dagen studie met het hele GM-gewas alleen dan uit te voeren indien daar door toxicologisch vooronderzoek aanleiding voor is (EFSA^{a,b,c}, 2011). Dit is niet het geval indien een genetisch gemodificeerd gewas 'substantieel equivalent' door bijvoorbeeld het GMO-panel van EFSA is bevonden aan de niet-GM isogene counterpart (EFSA, 2011). In het artikel uiten Séralini en medeonderzoekers kritiek op deze EFSA 'guidance' voor onderzoek naar de veiligheid van een genetisch gemodificeerd voedsel- en/of voedergewas (zie ook Séralini et al. 2011). Correct merken de auteurs op dat dierproeven tot nu toe niet worden vereist voor de vaststelling van 'substantieel equivalente' GMOs, Séralini et al. vinden dit echter een fout in het huidige veiligheidsonderzoek. Zij verwerpen principieel het door de EFSA geadviseerde gangbare gebruik van een voederproef die 90-dagen duurt indien daar door toxicologisch vooronderzoek aanleiding toe is. Het is de visie van Séralini et al. (2011, 2012) dat een blootstelling gedurende drie maanden onvoldoende is om



Bureau Risicobeoordeling &
onderzoeksprogrammering

Datum
1 oktober 2012

effecten voor de volks- en diergezondheid te kunnen beoordelen. In tegenstelling tot de 'guidance' van het GMO panel (EFSA^{a,b,c}, 2011) zijn Séralini en coauteurs van mening dat gezondheidseffecten van GM-gewassen onderzocht moeten worden met behulp van chronische studies; bijvoorbeeld overeenkomend met de levensduur van het proefdier.

De onderzoeksgroep van Gilles-Eric Séralini van de Universiteit van Caen in samenwerking met de Parijse commissie CRIIGEN heeft daarom een tweejarige voederstudie met ratten uitgevoerd waarbij zij gebruik heeft gemaakt van de genetisch gemodificeerde NK603 Roundup Ready-maïs van Monsanto (VS) en het onkruidbestrijdingsmiddel glyfosaat (Roundup). Hun studieopzet komt er in het kort op neer dat de onderzoekers een chronisch onderzoek in de rat uitvoerden met de Harlan Sprague-Dawley rat en fysiologische en biochemische bepalingen uitvoeren zoals gebruikelijk is voor een 90-dagen voederstudie de effecten in het proefdier bestudeerden. Één controlegroep, die gewone maïs at (33% in standaard proefdiervoer) en schoon drinkwater, werd vergeleken met zes groepen die het gewas (NK603) geteeld met of zonder Roundup in het voer (11%, 22% en 33%) kregen of met drie groepen die gewone maïs aten (33% in standaard proefdiervoer) en het middel met merknaam GT Plus in het drinkwater (50 ng/L, 400 mg/kg en 2,25 g/L glyfosaat). Zoals hierboven is beschreven is de samenstelling van de gebruikte glyfosaat-formuleringen niet gegeven wat wel zou moeten, omdat het niet ondenkbaar is dat een langdurige blootstelling aan de overige (hulp-)stoffen in de glyfosaat-formulering GT Plus negatieve effecten op de gezondheid van het proefdier zouden kunnen induceren (persoonlijke mededeling van Dr. Lars Niemann, BfR uit Duitsland). Het is merkwaardig dat auteurs de dosering glyfosaat van de middelste testgroep uitdrukken in mg per kilogram lichaamsgewicht en niet vermelden voor de overige twee testgroepen.

Controlegroepen die respectievelijk zijn gevoederd met 11 en 22% gewone maïs ontbreken in het proefprotocol. Ook ontbreken er resultaten van de uitgevoerde qPCR analyse van DNA monsters van de GM-maïs (NK603), auteurs refereerden dergelijke testen wel te hebben uitgevoerd.

Dit heeft tot gevolg dat de ratio maïs/standaard dieet niet in alle groepen gelijk blijkt te zijn geweest. Eventuele effecten zouden dus veroorzaakt kunnen zijn door onder andere verschillen in samenstelling van het dieet. Bijvoorbeeld het is bekend dat de voedselopname een invloed heeft op de tumorgroei (Tucker, 1979).

Vastgesteld wordt dat essentiële details die nodig zijn voor een goede risicobeoordeling van de inhoud en het onderzoek in het artikel van Séralini et al. ontbreken.



De auteurs hebben waargenomen dat de NK603gevoerde ratten eerder stierven met een versterkend effect op sterfte (mortaliteit) indien het gengewas met Roundup (WeatherMAX?) was behandeld. Ook duiden hun resultaten erop dat de genetisch gemodificeerde maïs met resistentie tegen glyfosaat tot vijfmaal meer borstkliertumoren (vrouwjesratten) en viermaal meer palpeerbare nier- en/of huidtumoren (mannetjes) induceerde bij levenslange blootstelling. Het aantal neoplasieën en grootte per individuele rat zijn niet gepubliceerd. De auteurs vermelden slechts de relatieve percentages of ratio's van neoplasieën (goed- en kwaadaardige kankers) per groep. In de publicatie van Séralini en coauteurs ontbreekt de histopathologische typering van neoplasieën per proefdier zoals gebruikelijk is in toxicologische publicaties.

Om resultaten van een carcinogeniteitstudie accuraat te kunnen beoordelen moet rekening worden gehouden met de incidentie van spontaan voorkomende tumortypen bij de Sprague-Dawley (SD) rat, aangezien het percentage melkkliertumoren bijvoorbeeld kan oplopen tot 50% in controlegroepen (Mann et al., 1996; Nakazawa et al. 2001) of hypofysetumoren (adenomas) tot 49% (mannetjes) en 75% (vrouwjes) volgens Baldrick (2005), en zelfs na verloop van tijd kan variëren binnen een laboratorium (genetische drift).

Het is een goede toxicologische werkwijze om met behulp van een databank met historische controledata (HCD) van de Harlan SD-rat te onderzoeken of de tumorresponsen in de studie door bijvoorbeeld genetische drift ongebruikelijk zou kunnen zijn door te vergelijken met wat normaal is. Dit doet men door vergelijking met het aantal en type neoplasieën in controledieren van een grote serie eerder uitgevoerde studies (bijv. Baldrick, 2005; Elmore en Peddada, 2009). Ook Séralini et al. pasten dit principe toe door hun effecten in behandelde groepen te vergelijken met gepubliceerde HCD's van spontane incidenties in de gebruikte rattensoort (Chandra et al. 1992; Brix et al. 2005). Zowel het National Toxicology Program (NTP) van het departement Health and Human Services (NIEHS) uit de VS als het Europese Agentschap voor Medicijnen (EMA) adviseren echter het gebruik van HCD's die studies samenvatten van de laatste 7 jaar, respectievelijk de laatste 5 jaar. Dit is door Séralini en coauteurs niet gedaan. Daarom zouden de Franse onderzoekers alsnog hun eigen HCD van de SD-rat of die van Harlan uit Frankrijk moeten overleggen voor nader onderzoek op biologische significantie van waargenomen effecten.

Niet onvermeld mag blijven dat een voedingskundige van de leverancier Harlan uit Amerika recent in een interview met Tim Worstall in Forbes aangeeft dat Harlan geen onderscheid maakt tussen GM-maïs en niet-genetische gemodificeerde varianten wat betreft de samenstelling van proefdiervoeders (Worstall, 2012). Met andere woorden het is goed denkbaar dat in Amerika herbicide-tolerante GM-maïs al langer aan ratten is gevoerd zonder het waarnemen van nadelige effecten op de diergezondheid.



Conclusies: antwoord op vragen

1. Zijn de argumenten van Séralini et al. om géén proefprotocol met een groepsgrootte van n=50 te gebruiken wetenschappelijk valide?

Nee, het aantal proefdieren van 10/sexe/dosering is te laag om een uitspraak te kunnen doen over verschillen in tumorincidenties tussen de diverse onderzoeksgroepen, d.w.z. ratten met of zonder kanker. Voor een chronische toxiciteitstudie zou het aantal proefdieren voldoende zijn (zie OECD Richtlijn 453), mits ondersteund met gegevens van groepen van 50 dieren/sexe/dosering in de gecombineerde carcinogeniteitstudie. Daarbij hebben Franse onderzoekers een rattensoort (Sprague-Dawley) gebruikt die bekend staat gevoelig te zijn voor de 'spontane' ontwikkeling – hogere incidentie – van melkklierkanker en hypofysetumoren en een grotere kans op allerlei gezondheidsproblemen aan het eind van hun leven (na twee jaar blootstelling). Séralini en coauteurs hebben geen gegevens gepubliceerd van een actuele databank met historische controlegegevens (HCD) van de gebruikte rattensoort. Verder is van belang dat de Franse onderzoekers geen statistische analyse van de effecten van de verschillende behandelingen op mortaliteit en tumorincidentie hebben uitgevoerd.

2. *Vindt RIVM-RIKILT de kritiek van Séralini et al. met betrekking tot de geadviseerde 90-dagen voederproef terecht en onderbouwd?*

Nee, de kritiek van Séralini en coauteurs is niet goed onderbouwd. De onderzoekers zijn selectief in het citeren van publicaties waarin alleen mogelijke nadelige effecten van GMO's in proefdieren of van glyfosaatformuleringen in celweek worden gerapporteerd zonder daarbij te vermelden dan meer dan 100 publicaties geen nadelige effecten rapporteren.

3. *Is de stof glyfosaat en/of residuen kankerverwekkend?*

Nee, de stof glyfosaat is in 2000 (EU) en 2004 (JMPR) beoordeeld en uitgevoerde carcinogeniteitstudies in muis en rat tonen aan dat glyfosaat geen carcinogeen is. De voornaamste metaboliet van glyfosaat in plant en milieu vertoont een lagere toxiciteit.

4. *Wat vindt het RIVM-RIKILT van de kwaliteit van de proefopzet en het rapporteren van resultaten, en de statistische analyse van eindpunten in relatie tot een gangbare toxicologische werkwijze?*

De kritiek van NVWA-BuRO wordt gedeeld (bijlage 1), waarbij RIVM en RIKILT opmerken dat Séralini en coauteurs geen statistische evaluatie hebben uitgevoerd met betrekking tot de waargenomen mortaliteit en tumorincidentie. Indien auteurs de gebruikelijke statistische analyse door



paarsgewijs toetsen van doseringsgroepen met controle(s) (en met een actuele HCD van de SD-rat) zouden hebben uitgevoerd is de verwachting dat er geen significante verschillen zijn in de resultaten van mortaliteit en tumorincidentie tussen de diverse groepen.

5. *Wat is het oordeel van RIVM-RIKILT over de verklaringen die onderzoekers geven ten aanzien van de oorzaak-effect relaties, zoals enerzijds een niet-lineaire hormoonontregeling door glyfosaat of anderzijds een niet-lineair effect door het transgen en/of metabole verstoringen als gevolg van de insertie?*

De studie van Séralini is qua uitvoering en rapportage ongeschikt om een uitspraak te kunnen doen over de veronderstelde niet-dosisgerelateerde hormoonontregeling. Een dergelijke conclusie zou zeer veel dieren vergen en een goede statistische analyse. De auteurs leggen verbanden tussen behandeling en effecten (oorzaak en gevolg) die op grond van de resultaten niet wetenschappelijk onderbouwd zijn.

Het is bijvoorbeeld bekend dat spontane hypofysetumoren vaak voorkomen bij Sprague-Dawley ratten met borstklierfibroadenoma's. Percy and Barthold rapporteerden in 1993 dat 90% van de ratten met borstklierfibroadenoma's (circa 80-95% van alle borsttumoren) hypofysetumoren hebben. Dit suggereert een verband tussen beide maligniteiten onder invloed van verhoogde concentraties aan circulerende groeihormonen (Pecceu, 2010).

Referenties

Baldrick, P. (2005) Carcinogenicity evaluation: comparison of tumor data from dual control groups in the Sprague-Dawley rat. *Toxicologic Pathology* 33:283-291. doi: 10.1080/019262390908371.

Brix, A.E. et al. (2005) Incidences of selected lesions in control female Harlan Sprague-Dawley rats from two-year studies by the National Toxicology Program. *Toxicol. Pathol.* 33: 477-483.

Chandra, M. et al. (1992) Spontaneous neoplasms in aged Sprague-Dawley rats. *Arch. Toxicol.* 66: 496-502.

Commissie. 2004/643/EG: Beschikking van de Commissie van 19 juli 2004 betreffende het in de handel brengen van een maïsprodukt (Zea mays L., lijn NK603), genetisch gemodificeerd met het oog op tolerantie voor glyfosaat, overeenkomstig Richtlijn 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad. PB L 295 van 18.9.2004, blz. 35-37.

EFSA. Scientific support for preparing an EU position in the 44th Session of the Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR). *EFSA Journal* 2012; 10(7):2859. doi:10.2903/j/efsa.2012.2859.



Bureau Risicobeoordeling &
onderzoeksprogrammering

Datum
1 oktober 2012

EFSA. Modification of the existing MRL for glyphosate in lentils. EFSA Journal 2012; 10(1):2550. doi:10.2903/j.efsa.2012.2550

EFSA^a. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Journal 2011; 9(5). doi:10.2903/j.efsa.2011.2150.

EFSA^b. Guidance on selection of comparators for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. EFSA Journal 2011; 9(5): 2149. doi:10.2903/j.efsa.2011.2149.

EFSA^c. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products for food and feed use. EFSA Journal 2011; 9(6): 2193. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2193.

EFSA^a. Reasoned opinion of EFSA: Modification of the residue definition of glyphosate in genetically modified maize grain and soybeans, and in products of animal origin. EFSA Journal 2009; 7(9). doi:10.2903/j.efsa.2009.1310.

EFSA^b. Applications (references EFSA-GMO-NL-2005-22, EFSA-GMO-RX-NK603) for the placing on the market of the genetically modified glyphosate tolerant maize NK603 for cultivation, food and feed uses, import and processing and for renewal of the authorisation of maize NK603 as existing products, both under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (Questions No EFSA-Q-2005-249, No EFSA-Q-2008-075). EFSA Journal (2009) 1137, 1-50.

EFSA-opinie "Safety and Nutritional Assessment of GM Plant derived Foods/Feed. The role of animal feeding trials" (2007)

Elmore, S.A., Peddada, S.D. (2009) Points to consider on the statistical analysis of rodent cancer bioassay data when incorporating historical control data. Toxicol. Pathol. OnlineFirst. July 2, 2009. doi:10.1177/0192623309339606, blz. 1-5.

European Medicines Agency. CPMP/SWP/2077/00. Note for guidance on carcinogenic potential. Operational. January 2003. <http://www.eudra.org/humandocs>.

Harkness, J.E., Wagner, J.E. (1977) The biology and medicine of rabbits and rodents. Lea and Febiger, Philadelphia, blz. 99.

Mann, P.C. et al. (1996) Proliferative lesions of the mammary gland in rats. Guides for Toxicologic Pathology. 2: 1-11.

Nakazawa, M., Tawaratini, T., Uchimoto, H. et al. (2001) Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats. Exp. Animals. Japanese



Association for Laboratory Animal Science 20(2):99-103.

Pecceu, E. (2010) Casus 1. Mamma tumoren bij de rat. In: Literatuurstudie in het kader van de Masterproef. Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde, Academiejara 2009-2010, blz. 1-18.

Percy, D.H., Barthold, S.W. (1993) Pathology of laboratory rodents and rabbits. Iowa State University Press, Iowa, USA.

Séralini, G.-E. et al. (2012) Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. Food and Chemical Toxicology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.005>

Séralini, G.-E. et al. (2011) Genetically modified crops safety assessments: present limits and possible improvements. Environ. Sci. Eur. 23

Snell, C. et al. (2012) Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. Food and Chemical Toxicology, 50 (3-4): 1134-1148.

Tucker, M.J. (1979) The effect of long-term food restriction on tumours in rodents. International Journal of Cancer 23:803-807.

Verordening (EG) Nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad van 27 januari 1997 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedsel ingrediënten. PB L 43 van 14.2.1997, blz. 1-6.

Verordening (EG) Nr. 1852/2001 van de Commissie van 20 september 2001 houdende nadere regels voor de openbaarmaking van bepaalde gegevens en de bescherming van ingevolge Verordening (EG) Nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad verstrekte gegevens. PB L 253 van 21.9.2001, blz. 17-18.

Verordening (EG) Nr. 1107/2009 van het Europees Parlement en de Raad van 21 oktober 2009 betreffende het op de markt brengen van gewasbeschermingsmiddelen en tot intrekking van de Richtlijnen 79/117/EEG en 91/414/EEG van de Raad. PB L 309 van 24.11.2009, blz. 1-50.

Verordening (EG) Nr. 1140/2009 van de Raad van 20 november 2009 tot wijziging van Verordening (EG) Nr. 1234/2007 houdende een gemeenschappelijke ordening van de landbouwmarkten en specifieke bepalingen voor een aantal landbouwproducten (integrale-GMO-verordening). PB L 312 van 27.11.2009, blz. 4-5.

Worstell, T. (2012) Proof perfect that the Seralini paper on GM corn and cancer in rats is rubbish. In: Forbes van 21 september 2012.



Bureau Risicobeoordeling &
onderzoeksprogrammering

Datum
1 oktober 2012

www.forbes.com/.../proof-perfect-that-the-seralini-paper-on-gm-corn-and-cancer-in-rats-is-rubbish/



RIVM-RIKILT FRONT OFFICE VOEDSELVEILIGHEID

BEOORDELING INZAKE ARTIKEL SÉRALINI et al. 2012 in FOOD and CHEMICAL TOXICOLOGY

Risicobeoordeling aangevraagd door:	Hub Noteborn (NVWA, BuRO)
Risicobeoordeling opgesteld door:	<i>RIVM en RIKILT</i>
Datum aanvraag:	24-09-2012
Datum risicobeoordeling:	01-10-2012 (definitieve versie)
Coördinator:	Suzanne Jeurissen
Opstellers risicobeoordeling:	Gerrit Wolterink, Wout Slob, Karin Mahieu (RIVM), Maryvon Noordam (RIKILT)
Toetsers risicobeoordeling:	Bernadette Ossendorp, Mirjam Luijten (RIVM), Boet Glandorf (BGGO/RIVM), Esther Kok (RIKILT)
Projectnummers:	V/320110/12/AA en V/320800/12/AA

Onderwerp

In het wetenschappelijke tijdschrift Food and Chemical Toxicology is een studie gepubliceerd, geschreven door Séralini G-E, Clair E. et al. (2012) met als titel: "Long term toxicity of a RoundUp herbicide and RoundUp-tolerant genetically modified maize". In de publicatie wordt gesteld dat nu is aangetoond dat levenslange blootstelling aan een glyfosaat-tolerante GM-maïs (NK603) en/of een commerciële glyfosaat-bevattende formulering (RoundUp) leidt tot zeer ernstige ziekteverschijnselen in de Sprague Dawley rat. De publicatie heeft wereldwijd tot ophef geleid en binnen de Europese Unie gaan stemmen op om de grenzen te sluiten voor genetisch gemodificeerde gewassen.

Vraagstelling

Wat is het wetenschappelijk oordeel van RIVM-RIKILT over het onderzoek van Séralini en medeauteurs (2012)?

Daarbij zijn de volgende subvragen van belang:

1. Zijn de argumenten van Séralini et al. om géén proefprotocol met een groepsgrootte van n=50 te gebruiken wetenschappelijk valide?

Citaat: "we had no reason to settle at first for a carcinogenesis protocol using 50 rats per group. However we have prolonged the biochemical and hematological measurements or disease status recommended in combined chronic studies using 10 rats per group (up to 12 months in OECD 453). This remains the highest number of rats regularly measured in a standard GMO diet study."

2. Vindt RIVM-RIKILT de kritiek van Séralini et al. met betrekking tot de geadviseerde 90-dagen voederproef terecht en onderbouwd?



Zie bijvoorbeeld publicatie van o.a.: Snell et al. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. Food and Chemical Toxicology, Volume 50, Issues 3-4, March-April 2012, Pages 1134-1148 (hieronder) en de EFSA-opinie "Safety and Nutritional Assessment of GM Plant derived Foods/Feed. The role of animal feeding trials"(2007) (bijlage)

3. Is de stof glyfosaat en/of residuen kankerverwekkend?
4. Wat vindt het RIVM-RIKILT van de kwaliteit van de proefopzet en het rapporteren van resultaten, en de statistische analyse van eindpunten in relatie tot een gangbare toxicologische werkwijze?
5. Wat is het oordeel van RIVM-RIKILT over de verklaringen die onderzoekers geven ten aanzien van de oorzaak-effect relaties, zoals enerzijds een niet-lineaire hormoonontregeling door glyfosaat of anderzijds een non-lineair effect door het transgen en/of metabole verstoringen als gevolg van de insertie?

Conclusie

- 1) Om uitspraken te kunnen doen over het kankerverwekkend zijn van een stof, product of GGO, is de door Séralini gebruikte opzet niet geschikt. Daarvoor had een hoger aantal ratten per groep ingezet moeten worden. Vanwege de kleine groepsgrootte kan toeval de gevonden verschillen tussen de controle en de behandelde groepen in deze studie verklaren. Een verdere tekortkoming is dat in de publicatie geen statistische analyse van de aantallen waargenomen dieren met tumoren (en enkele andere effecten) is opgenomen.
- 2) In de publicatie van Séralini et al. (2012) wordt de EFSA niet genoemd, wel staat vermeld dat 'Currently, no regulatory authority requests mandatory chronic animal feeding trials to be performed for edible GMOs and formulated pesticides'. EFSA adviseert om een 90-dagen studie met het hele GGO-product alleen uit te voeren indien daar aanleiding voor is. Dit is niet het geval indien een GGO-product 'substantieel equivalent' is bevonden aan de niet-GGO isogene counterpart (EFSA, 2011). De opmerking van Séralini et al. dat dierproeven tot nu toe niet worden vereist voor substantieel equivalente GGOs is dus correct, maar er is geen aanleiding om dit te veranderen.
- 3) Volgens de JMPR (2004) en de EC (2002) zijn glyfosaat en/of residuen van glyfosaat niet kankerverwekkend.
- 4) Door het lage aantal dieren per groep is het zeer waarschijnlijk dat waargenomen verschillen berusten op toeval. De fracties dieren met dergelijke tumoren nemen niet duidelijk toe met toenemende dosis.
- 5) Deze studie is qua opzet, uitvoering en rapportage ongeschikt om een uitspraak te kunnen doen over de veronderstelde niet-dosisgerelateerde hormoonontregeling. Een dergelijke conclusie zou zeer veel dieren vergen en een goede statistische analyse. Een andere conclusie betreft de biochemische veranderingen in de dieren in de toxiciteitsproef. Deze conclusie is niet te verifiëren omdat de onderliggende data niet terug te vinden zijn in de publicatie. De auteurs leggen verbanden tussen behandeling en effecten die op grond van de resultaten niet wetenschappelijk onderbouwd zijn.

Toelichting



Vraag 1

Het aantal proefdieren 10/geslacht/dosis is te laag om een uitspraak te kunnen doen over het al dan niet kankerverwekkend zijn van een agens. Voor een chronische toxiciteitsstudie is dit aantal voldoende (OECD 453), mits ondersteund met gegevens van de 50 dieren/geslacht/dosis in een gecombineerde carcinogeniteitsstudie. "For a thorough biological and statistical evaluation of the study each dose group should at least contain 50 animals of each sex. Each dose group and concurrent control group intended for the chronic phase of this study (OECD 453 and not TG 452, which requires a higher number) should contain at least 10 animals/sex." Conclusie: 10 dieren/geslacht/dosis is niet genoeg om uitspraken te kunnen doen over verschillen in aantallen dieren met of zonder kanker.

Hierbij kan worden opgemerkt dat in de publicatie van Séralini geen statistische analyse van de effecten van de verschillende behandelingen op de mortaliteit en tumorincidentie is uitgevoerd. De conclusies van Séralini t.a.v. tumoren en de andere gerapporteerde effecten hebben daarom geen enkele basis.

Vraag 2

De kritiek die Séralini heeft op de studie van Snell et al., 2011 is niet goed gefundeerd. De auteur haalt selectief enige publicaties aan waarin wel effecten van GGOs op proefdieren c.q. RoundUp formuleringen op celcultures worden gevonden, maar gaat echter geheel voorbij aan de vele (geschat meer dan 100) publicaties waarin GGOs gedurende 90 dagen of langer gevoerd zijn aan proefdieren waarin geen effecten werden gevonden. Daarnaast wekt hij in dezelfde alinea de suggestie dat, als studies zouden zijn uitgevoerd volgens het protocol zoals beschreven in zijn eigen publicatie, chronische GMO voederstudies wel gezondheidseffecten zouden aantonen. Daar deze studie niet geschikt is om hierover enige uitspraak te doen is dit ook geen steekhoudend argument om de conclusies uit de studie van Snell et al. te ondermijnen.

In de publicatie van Séralini et al. (2012) wordt EFSA niet genoemd, wel meldt men dat 'Currently, no regulatory authority requests mandatory chronic animal feeding trials to be performed for edible GMOs and formulated pesticides'. EFSA adviseert om een 90-dagen studie alleen uit te voeren indien daar aanleiding voor is. Dit is niet het geval indien een GMO 'substantieel equivalent' is bevonden aan de niet-GGO isogene counterpart (EFSA, 2011). De opmerking van Séralini et al. dat dierproeven tot nu toe niet worden vereist voor substantieel equivalente GGOs is dus correct, maar er is geen aanleiding om dit te veranderen.

Vraag 3

Het herbicide met de commerciële naam RoundUp bevat als actieve stof glyfosaat. De overige bestanddelen van het gebruikte middel worden niet vermeld. Op basis van deze studie kan niet worden geconcludeerd dat (residuen van) glyfosaat (in de vorm van RoundUp,) of het genetisch gemodificeerde maïs alleen, of het genetische gemodificeerde maïs in combinatie met RoundUp of RoundUp alleen carcinogeen is (zie antwoorden op vragen 1 en 5 ten aanzien van de kwaliteit van de studie).

De toxiciteit van de actieve stof glyfosaat is in 2000 in de EU beoordeeld (EU, 2000) en in 2004 door JMPR beoordeeld (JMPR, 2004). De conclusie in beide evaluaties is dat glyfosaat niet carcinogeen is in goed uitgevoerde carcinogeniteit studies in muizen en ratten. Daarnaast concludeert de JMPR in 2011 dat AMPA (de voornaamste metaboliet in de plant en in het milieu) minder toxisch is dan glyfosaat (JMPR, 2011). De door de JMPR vastgestelde ADI voor glyfosaat en AMPA van 1 mg/kg bw/day is gebaseerd op effecten op de speekselklieren gezien in de chronische/carcinogeniteit studies (NOAEL 100 mg/kg bw/day).



Opgemerkt wordt dat de auteurs aansturen op effecten ten gevolge van blootstelling via voeding/water aan een glyfosaat bevattend middel met de merknaam GTplus, door de auteurs aangeduid als RoundUp (wat anders is dan de actieve stof alleen) en via het eten van genetisch gemodificeerd NK603 maïs. Ze trekken dus niet direct de conclusies ten aanzien van de actieve stof glyfosaat zelf in twijfel.

Vraag 4

Séralini et al. hebben geen resultaten gerapporteerd van een statistische analyse op de effecten op mortaliteit en tumorincidentie. Indien deze wel zou zijn uitgevoerd dan zou de gebruikelijke analyse (paarsgewijs toetsen van dosis groepen met de controle) voor deze parameters geen statistisch significante verschillen aangetoond hebben. Dat valt op basis van een studie met deze kleine aantallen dieren per dosis ook niet te verwachten. Door het geringe aantal dieren per groep is het zeer waarschijnlijk dat de waargenomen verschillen berusten op toeval.

De resultaten voor dieren met tumoren worden (in tabel 2) samengevat door de aantallen tumoren per dier bij elkaar op te tellen, terwijl het aantal dieren met een of meer tumoren tussen haakjes vermeld staat. In carcinogeniteit-studies wordt normaal gesproken het aantal dieren met tumoren vermeld en niet het totaal aantal tumoren.

Op de biochemische data is wel een statistische analyse uitgevoerd. Echter, de onderliggende data zijn niet terug te vinden in de publicatie en de gekozen statistische methode (two class discriminant analyse) voor de data-analyse lijkt erop gericht verschillen te vinden in plaats van te onderzoeken of er verschillen in biochemische parameters tussen de onderzoeksgroepen en de controlegroep aangetoond kunnen worden. Deze conclusies betreffende de biochemische veranderingen in de dieren in de toxiciteitsproef zijn niet te verifiëren.

De fracties dieren met tumoren nemen niet duidelijk toe met toenemende dosis. Séralini et al. voeren aan dat het ontbreken van een dosis-respons relatie te wijten is aan een effect op de hormoonhuishouding, echter zonder hiervoor verdere uitleg aan te dragen. Met het gehanteerde geringe aantal dieren is te verwachten dat de waargenomen fracties dieren met respons grillig zullen zijn, zelfs al zou er wel degelijk sprake van een normale dosis-respons relatie zijn.

Verder wordt het zeer onwaarschijnlijk geacht dat NK603 maïs dezelfde werking zou hebben als de in de studie gebruikte glyfosaat formulering.

Enige aanvullende punten van kritiek:

- Uit de materialen en methoden blijkt dat bij de controle dieren en bij de dieren die de hoogste dosis GGO maïs ontvingen, respectievelijk 33 % controle maïs of 33% GGO (NK603) maïs in het standaard dieet was verwerkt. De dieren die de lagere doses GGO maïs ontvingen hadden een standaard dieet waarin respectievelijk 11 en 22% GGO maïs was verwerkt. De controles met resp. 11 en 22% controle maïs ontbreken dus. De ratio maïs/standaard dieet was dus niet gelijk in alle groepen. Eventuele effecten kunnen dan ook veroorzaakt worden door verschillen in het dieet die niets met het GGO maïs te maken hebben.
- De studie is zeer gebrekkig gerapporteerd. Vele details die nodig zijn voor een goede beoordeling ontbreken, zoals bijvoorbeeld gegevens over analyseresultaten van de GGO maïs en de controle maïs, de rattenvoeders, voeder- en waterconsumptie, en over de groei van de ratten, en over het al dan niet geblindeerd zijn van de studie. Een statistische analyse van o.a. consumptie, groei, mortaliteit, en kankerincidentie en multiplicité is niet uitgevoerd dan wel niet in het artikel opgenomen, en essentiële gegevens over de wel uitgevoerde statistische analyse van de biochemische data ontbreken.



- De auteurs claimen een effect op de hormoonhuishouding. In de omschrijving van de uitvoering van de studie (materiaal en methoden) lijkt er echter geen rekening gehouden te zijn met de fase van de cyclus van de vrouwelijke dieren op moment van bloedafname. Dit in combinatie met een laag aantal dieren per groep maakt dat de gevonden verschillen in estradiol spiegels zeer goed kunnen berusten op toeval.

Vraag 5

De studie van Séralini is qua uitvoering en rapportage ongeschikt om een uitspraak te kunnen doen over de veronderstelde niet-dosisgerelateerde hormoonontregeling. Een dergelijke conclusie zou zeer veel dieren vergen en een goede statistische analyse. De auteurs leggen verbanden tussen behandeling en effecten die op grond van de resultaten niet wetenschappelijk onderbouwd zijn.

Referenties:

Joint WHO/FAO Meeting on Pesticide Residues (2004) Pesticide residues in food – 2004. Toxicological evaluations. Glyphosate. Beschikbaar via: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2004pr01.pdf>.

Joint WHO/FAO Meeting on Pesticide Residues (2011) Pesticide residues in food – 2011. REPORT 2011. Glyphosate. Beschikbaar via: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Glyphosate.pdf

European Commission (2002) Review report for the active substance glyphosate. Glyphosate 6511/VI/99-final – 21 January 2002. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_glyphosate_en.pdf

European Food Safety Authority (2011) Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. EFSA Journal, 9, 2193. Beschikbaar via: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2193.htm>.

Séralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, Spiroux de Vendômois J (2012) Long term toxicity of a RoundUp herbicide and a RoundUp-tolerant genetically modified maize. Food and Chemical Toxicology, in press.

Snell C, Bernheim A, Bergé J-B, Kuntz M, Pascal G, Paris A, Ricroch AE (2011) Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: a literature review. Food and Chemical Toxicology, 50, 1134–1148.

Afkortingen:

GM = Genetically Modified
GMO = Genetically Modified Organism
GGO = Genetische Gemodificeerd Organisme

BIJLAGE 2



Emerging Risks Unit

28 September 2012

Teleconference with Member States on Séralini et al. study 28 September 2012, 10.30-12.30 1st Meeting Report

Participants: EFSA Response Team (RT)

- PB (GMO - Chair)
- TR (EMRISK – administrative coordinator)
- AC (EMRISK)
- AR (EMRISK – minute taker)
- DV (SAS)
- SB (SAS)
- HF (PRAS)
- MT (PRAS)
- EW (GMO)
- CO (GMO)
- KH (EDIT)
- SN (AFSCO)
- RH (EDIT)

Participants: Member States

- PC (WIV-ISP; BE)
- PH (WIV-ISP; BE)
- HN (NVWA; NL)
- JCL (Anses; FR)
- CG (HautConceilBiotechnologies, FR)
- AP (BfR; DE)
- LN (BfR; DE)
- AL (BfR; DE)

Apologies

- JF (EFSA, AFSCO)

1. Agenda

Time	Topic	Who
10:30-10:45	General introduction and tour de table	EFSA, PB
10:45-11:00	Mandate, approach and preliminary conclusions	EFSA, SB
11:00-11:15	Mandate, approach and preliminary conclusions	Netherlands, HN
11:15-11:30	Mandate, approach and preliminary conclusions	Germany, LN, AP & AL
11:30-11:45	Mandate, approach and preliminary conclusions	France, CG & JCL
11:45-12:00	Mandate, approach and preliminary conclusions	Belgium, PC & PH
12:00-12:15	Overview	EFSA and All
12:15-12:30	Identification of action points and follow up on exchange of information	All

2. Summary of key points

• General introduction and tour de table

PB welcomed MS and introduced rapidly the EFSA Response team (RT). No tour de table due to time constraint.

• EFSA: Mandate, approach and preliminary conclusions

Mandate: PB presented the mandate and agenda of the EFSA RT that was presented at the AF meeting on 26-27/09 at EFSA. EFSA needs to collaborate with MS in order to discuss scientific concerns and avoid divergence. EFSA is requested to review the paper and request clarifications from the authors as needed and to indicate if EFSA's opinion on NK603 and its stacks needs to be reconsidered. EFSA will issue a statement by mid-next week and a final assessment by the end of October. The outputs will be published on the EFSA website.

Approach: SB presented the approach of EFSA and the key structure and points of the statement :

- Abstract (aiming to be readable by general public)
- Scientific Approach:
 1. EU approach for toxicological assessment (GMO and Pesticides)
 2. Review of Séralini et al. paper (overview on the experiment and protocol; critical review with pending issues)
- Conclusions (aiming to be readable by general public)

Preliminary conclusions: The critical review addresses objectives, animals and feeding conditions, study design, sample size/power calculation, statistical methods, endpoint reporting. The pending issues highlight gaps and missing elements cited in the previous sections. In summary, it is concluded that this paper is of poor quality both in terms of reporting and clarity. The conclusions made by the authors cannot be supported and, based on the paper, there is no evidence for a need for re-evaluation of NK603 and glyphosate.

PB asked MS if they had any questions, clarification needs or any diverging views. France (JCL) asked who were the authors of the assessment. PB explained that the statement is drafted by EFSA staff from the SAS, GMO and PRAS Units.

• Netherlands: Mandate, approach and preliminary conclusions

Mandate: NVWA received a request from Secretary of the Ministry of Economic Affairs, Agriculture and Innovation (EL&I) and the Minister of the Ministry of Public Health, Welfare and Sports (VWS) to critically evaluate (review) the paper. Scientific advice should be delivered by 3th October.

Approach: multidisciplinary task force was set up by institutes RIKILT and RIVM, to analyse the paper by Seralini et al.

Preliminary conclusions: criticisms were raised to the study design (not compliant with OECD guidelines, rat strain Sprague Dawley not adequate due to high cancer incidence background, and no comparison with an own or other actual (i.e. covering studies of last 5 to 7 years) HCD of Harlan SD-rats), the sample size (low animal number in control and treatment groups), statistical analysis (basic and missing for many endpoints), and an overall lack of information (adjuvants/ingredients of WeatherMax and GT Plus, compositional analysis of GM maize and control maize, diets, feed and water consumption or growth rate etc.). To summarize, study design, way research was conducted and reporting are not suitable to be able to come to a science-based conclusion on, for instance, the supposed non-dose related endocrine disruption or non-dose related metabolic disturbance due to the insertion.

Additional information: Advice (opinion) will be published on the NVWA website by end of next week, and the Secretary of Agriculture (EL&I) will use NVWA's opinion to answer questions posed by members of the House of Representatives (Tweede Kamer) on October the 8th during the general consultation (AO) on "Pesticides".

- **Germany: Mandate, approach and preliminary conclusions**

Mandate: on behalf of the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV) the Federal Institute for Risk Assessment (BfR) has received a request from the Department Genetic Engineering of the Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL) to evaluate the publication by Seralini et al., (2012). BfR is going to deliver an opinion on 28th September. Deadline for the final BVL report to the BMELV is 19th October. BfR has received a second request from the Department Plant Protection Products of the BVL asking for a scientific evaluation of the new data. An opinion should be delivered by 19th October.

Approach: the Seralini publication has been assessed by a multidisciplinary working group of experts from different BfR Departments. A letter with specific questions to the authors and asking for the complete study report was sent to Seralini 21th September. The BfR evaluation is confined to the study and does not address issues related to the risk assessment of GM plants as outlined in the respective EFSA guidance document.

Preliminary conclusions: BfR has noticed that for the first time a long-term feeding study was performed with a formulation containing the active ingredient glyphosate (Roundup), but no detailed information on the formulation was provided. The main criticisms and conclusions regarding the study are in line with those of the other MS, i.e.: not performed in line with relevant OECD Guidelines, low animal number per group in combination with a high rate of spontaneous tumours, information on diet composition and administered (glyphosate) doses missing, maize not analysed for mycotoxins, incomplete data reporting, no detailed specification of pathologies, practically no statistical analysis, anticipated endocrine effects not substantiated by experimental data. Therefore the main conclusions are not comprehensible.

Additional information: the opinion is going to be published on the BfR website by the beginning of next week.

- **France: Mandate, approach and preliminary conclusions**

Mandate: ANSES and HCB received a joint mandate from the Ministries of Agriculture, Ecology, Health and Economy. The Mandate is asking HCB and Anses to analyse the study in order to determine whether it puts in question the conclusions of previous risk assessment of NK603, and in particular whether it can be considered as conclusive about the security of food and feed containing NK603. In addition, Anses is specifically asked to determine whether the study may put in question the conclusions of past Anses assessments of Roundup herbicide. Based on their analysis, HCB and Anses are asked to evaluate whether the protocol and the conclusions of the study put in question the current guidelines, or guidelines in preparation, with respect to sanitary risk assessment.

An opinion is requested by October 20th for the first two questions, and by November 20th for the last question,

Approach: Seralini publication will be assessed by multidisciplinary experts of just constituted working groups in Anses and in HCB.

Preliminary conclusions: no preliminary conclusions can be drawn at this stage as Anses/HCB expert WG have just started their expertise work; criticisms in line with other MSs.

Additional information: meetings with Industry and the authors have been planned. Moreover, control historical data have been sent by the animal supplier (Harlan).

- **Belgium: Mandate, approach and preliminary conclusions**

Mandate: For the GMO part, mandate received by the Biosafety Advisory Council (BAC) from the Minister of Public Health. Conclusions (critical review of the Seralini paper with the aim to evaluate whether the current decision for marketing of NK603 needs to be revised) are expected by the end of October. For the pesticide part, no official mandate but critical analysis of Toxicology Unit of WIV-ISP sent to the Competent Authority.

Approach: For the GMO part, multidisciplinary experts have been contacted. Their advices will be collected, and will serve as basis to draft the final advice of the BAC that will be sent to the Minister and published on the website of the BAC.

Preliminary conclusions: For the GMO part, it's too early to draw conclusions. For the pesticide part, comments were in agreement with the other MSs. In addition, lack of dose-response in the study and food composition analysis methodology have been highlighted.

- **All: Overview**

EFSA and MS share the same concerns about the publication of Séralini et al. on reporting and clarity, statistical analysis, sampling size, animal strain, etc. (see above).

In relation to the peer-review process leading to the publication of this study, Belgium (PC) suggested to write to the editor of the journal regarding the identified scientific weaknesses; This might be worthwhile, however, it should be noted that it seems that the scientific community is already reacting on this issue. It is understood that Elsevier has received a significant number of letters requesting the reconsideration of the reviewing procedure for this paper.

- **All: Identification of action points and follow up on exchange of information**

France (CG) can share historical data on rats. EFSA is interested to receive these.

For the mutual benefit of all involved, it would be beneficial if mandates, documents and information would be shared among all. To this end EFSA plans to create a shared access internet repository (Sciencenet: EFSA extranet)

ACTION 1.1. EFSA creates a space on the EFSA-extranet for exchange of information

ACTION 1.2. EFSA uploads mandate from DG SANCO on the shared space on EFSA-extranet

ACTION 1.3. France sends EFSA data on historical data of rats for uploading on the shared space on EFSA-extranet.

3. Acronyms, stakeholders, links to key files or URLs etc

1. Acronyms

Acronyms	Definitions
AF	Advisory Forum
AFSCO	Advisory Forum & Scientific Cooperation
AMT	Advice Management Team
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
BfR	Federal Institute for risk assessment, Germany
BMELV	Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection
EDIT	Editorial and Media Relations
EMRISK	Emerging Risks Unit
HCB	Haut Conseil des Biotechnologies
MS	Member States
MTG	Meeting
NVWA	Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
RIKILT	Institute of Food Safety, Netherlands
RIVM	National Institute for Public Health and the Environment, Netherlands
RT	Response Team
SAS	Scientific Assessment Support Unit
TC	Teleconference

2. Links and URLs to Key files

A new science project was created to allow exchange of information between EFSA and MS. It is accessible here:

Collaboration Document Folder: **Seralini Study EFSA & MS**

https://sciencenet.efsa.europa.eu/portal/server.pt/gateway/PTARGS_32_0_229_0_-1_47/http:/bea-aps.efsa.eu.int;11930/collab/do/document/overview?projID=848332&folderID=848336

Subscribe to this folder:

https://sciencenet.efsa.europa.eu/portal/server.pt/gateway/PTARGS_32_0_229_0_-1_47/http:/bea-aps.efsa.eu.int;11930/collab/do/subscription/manageSubscription?subscription=ZXZlbnRpZD0yMDAxK29iamVidGlkPTArchJvamVdGlkPTg0ODMzMit1c2VyaWQ9NzQ5MjErcG9ydGFsaWQ9LTlY29tbWFuZGlkPTE%3D&fromNotification=true

4. Addendum

Full text of The Netherlands (NVWA) Preliminary Conclusions

Mandate

The Netherlands Food Safety Authority (NVWA) will next week deliver its scientific review of a new study which states concerns over the potential toxicity of a herbicide containing glyphosate and of glyphosate-tolerant GM (NK603) maize. Besides representatives of the Office for Risk Assessment and Research (BuRO) of NVWA, a multi-disciplinary task force was set up by the institutes RIVM and RIKILT and has analysed the paper by Séralini et al. This work will address a request for scientific advice from the House of Representatives as forwarded to the Secretary of the Ministry of Agriculture (EL&I) and Secretary of the Ministry Environment (I&M) following by a general consultation "Pesticides" before October the 8th. NVWA has been asked to consider the significance of the study's findings of Séralini et al. as part of its ongoing statutory remit to monitor scientific developments relating to its work which is the assessment of food/feed safety and its related risks.

Preliminary conclusions

In general, the reporting of the research performed by Séralini et al. is very imperfect. Many details that are essential for a proper assessment are missing, such as for example the compositional analysis of the GM maize and control maize, the rodent diets, feed and water consumption or growth rate, and information about whether or not the study was blinded. A statistical analysis of amongst others, consumption, growth rate, mortality, and cancer incidence and multiplicity has not been carried out or included in the paper, and essential data about the statistical analysis of biochemical data that was carried out are missing.

1) The aim of Séralini et al (2012), as far as can be judged from the publication, was to carry out a chronic/long-term feeding trial using the usual parameters for a 90-day study (supplemented by some additional parameters). The setup of the study is complicated and does not follow clearly one of the OECD guidelines for laboratory animal research. Generally speaking, to be able to assess the carcinogenicity of a substance or product, the setup as selected by Séralini et al. is not suitable. The rat species chosen for this study - Sprague Dawley - is one strain with a high background incidence for certain types of cancer such as mammary gland tumours and pituitary cancer upon ageing i.e. the end of the rat's lifetime. A higher number of rats per experimental group than 10/sex/dose should have been used. Because of the small group size in this feeding study, the differences between the control and treated groups can be explained as being coincidence. It is all the more a major information gap that the publication does not include a statistical analysis of the effects of the various treatments on mortality and tumour incidence and/or has not been carried out. The conclusions of Séralini et al. related to tumours and the other reported effects therefore have no scientific basis.

More specifically, the number of animals, 10/sex/dose, is too low to be able to conclude whether or not an agent is carcinogenic. For a chronic toxicity study this number (n=10) is sufficient (OECD guideline 453), provided this is supported with data from the n=50 animals/sex/dose in the combined carcinogenicity study. "For a thorough biological and statistical evaluation of the study each dose group should at least contain 50 animals of each sex. Each dose group and concurrent control group intended for the chronic phase of this study (OECD 453 and not TG 452, which requires a higher number) should contain at least 10 animals/sex."

Additionally, the materials and methods section describes that 33% control maize and 33% GM (NK603) maize was processed into the standard rodent diet of respectively the control animals and the test animals as the highest dose. The animals that received the lower doses of GM (NK603) maize had a standard rodent diet in which respectively 11 and 22% GM-maize was processed. However, results of the controls fed with 11 and 22% control maize in their diet are missing in the paper. The ratio maize/standard rodent diet was therefore not equal in all animal groups. It may mean that effects could also be caused by these differences in diets which have nothing to do with the nature of the GM-(NK603) maize.

2) The publication of Séralini et al (2012) reports that 'currently, no regulatory authority requests mandatory chronic animal feeding trials to be performed for edible GMOs and formulated pesticides'. Whereupon reference is made selectively to some publications in which, according to the authors, adverse effects are found of inclusion of GMOs in the diet of experimental animals or in that case of Roundup formulations on cell cultures. The authors are completely ignoring the many (estimated more than 100) publications in which diets containing different percentages of GMOs are fed during 90 days or longer to experimental animals and where no adverse effects on health were found (Snell et al. 2007). The remark by Séralini et al. that animal experiments so far are not required for substantially equivalent GMOs is correct, but there is no reason to change this. EFSA recommends conducting a 90-day feeding study with the whole GMO product only if appropriate. This is not the case when a GMO product is considered to be 'substantial equivalent' to a non-GM isogenic counterpart (EFSA, 2011).

On the other hand, in the same paragraph Seralini and co-authors suggested that, if studies were carried out according to the protocol as described in their new publication, chronic GMO feeding trials would demonstrate health effects. Although their study is not suitable to base conclusions on, this is also not a cogent argument to undermine the conclusions, for instance, from the study of Snell et al. (2007) .

3) According to the JMPR (2004) and the EC (2002), glyphosate and/or residues of glyphosate are not carcinogenic.

The herbicide with the commercial name Roundup contains as active substance glyphosate. Other constituents of the formulation are not listed. Based on the article of Seralini et al., it cannot be concluded that (residues of) glyphosate (in the form of Roundup*,) or the genetically modified NK603 maize alone, or the GM (NK603) maize in combination with Roundup or Roundup alone, are carcinogenic.

* It should be noted that the authors studied effects in rats resulting from exposure to a commercial product that contains glyphosate with the brand name GTplus, which is referred by the authors as being Roundup.

More specifically, the toxicity of the active substance glyphosate has been assessed in the EU in 2000 and in 2004 by JMPR. It was evaluated that glyphosate is not carcinogenic as could be concluded from well-conducted carcinogenicity studies in mice and rats. In addition, JMPR concludes that AMPA (the principal metabolite in plants) is less toxic than glyphosate. The ADI for glyphosate established by JMPR of 1 mg/kg bw/day is based on effects on the salivary glands as seen in chronic/carcinogenicity studies (NOAEL 100 mg/kg bw/day).

4) Seralini et al. have not demonstrated significant effects on mortality and tumour incidence, because a statistical analysis was not carried out. If a statistical analysis would have been carried out, than the usual analysis by pairwise testing of dose groups compared to control for these parameters would not have led to statistically significant differences. That is also not to be expected on the basis of a study design with such small numbers of animal per dose group. Because of the low number of animals per group, it is the very probable that the observed differences are based on coincidence.

More specifically, the number of animals with for example mammary gland and pituitary tumours did not increase clearly with increasing the dose of GM (NK603) maize or glyphosate in the drinking water. The authors argue that there is a 'threshold response' triggered by an impact on the endocrine system. This is however not a scientifically sound conclusion, because thresholds with 10 animals per dose group will completely lie outside the statistically observable area.

With the small number of animals used, it is to be expected that the observed part of animals with an adverse response will be erratic, even if there is a normal dose-response relationship. Furthermore, it is considered highly unlikely that the GM (NK603) maize will have the same effect in rodents as the glyphosate formulation used.

As mentioned before the authors claim an effect on the endocrine system. From the description of the study (material and methods), it seems that the phase of the cycle of the female animals at the time of blood collection has not been taken into account. This, in combination with a too low number of animals per test group, can lead to differences in estradiol concentrations that may very well be based on coincidence.

To summarize, the study design, the way research was conducted and the reporting of the results are not suitable to be able to come to a science-based conclusion on the supposed non-dose related endocrine disruption. Such a conclusion would require many more animals and a proper statistical analysis.

Another concern relates to the biochemical changes observed between various test groups if compared to the controls. The author's conclusion is not verifiable: the underlying data are not included in the publication and the statistical method chosen for the data analysis, i.e. two class discriminant analysis, seemingly aims to find differences than rather testing whether there can be differences demonstrated in the measured biochemical parameters between treated animals and the control group.

Finally, the authors link treatment and effects that are not scientifically underpinned by their results observed in the long term feeding trial¹¹.

HN (NVWA-BuRO)

