



**WETENSCHAPPELIJK COMITÉ
VAN HET FEDERAAL AGENTSCHAP VOOR DE VEILIGHEID
VAN DE VOEDSELKETEN**

ADVIES 06-2009

Betreft : Melamine in melk voor (opvolg)zuigelingenvoeding (dossier Sci Com 2008/25)

Advies gevalideerd door het Wetenschappelijk Comité op 13 maart 2009.

Samenvatting

In China werden t.g.v. een frauduleuze verontreiniging van melk en melkpoeder met melamine meer dan 51.900 zuigelingen en jonge kinderen in het ziekenhuis opgenomen en overleden ten minste zes baby's. Melamine is een chemische stof die onder meer gebruikt wordt bij de fabricage van plastics, coatings, vlamvertragers, harsen en lijm. Melamine, dat niet carcinogeen, genotoxisch of teratogeen is, blijkt echter bij langdurige blootstelling de vorming van nierstenen tot zelfs nierfalen te veroorzaken.

Op basis van de beschikbare gegevens is het mogelijk een actielimiet (maximaal gehalte) te bepalen. Er dient evenwel opgemerkt te worden dat er nog vele lacunes bestaan, in het bijzonder m.b.t. de toxicologische eigenschappen van melamine (en analogen) bv. bij langdurige blootstelling van kinderen. Bovendien wenst het Wetenschappelijk Comité te benadrukken dat de concentraties aan mogelijke verontreinigingen in (opvolg)zuigelingenvoeding steeds zo laag mogelijk als redelijkerwijs haalbaar is, dienen te zijn. Aan de consument wordt aangeraden zich te houden aan de erkende merken van (opvolg)zuigelingenvoeding, waarvan de samenstelling dient te voldoen aan wettelijke normen.

Bijkomend dient opgemerkt te worden dat het probleem lange tijd kan aanslepen gezien het stokeerbare producten betreft (melkpoeder, etc.) en wordt aan de industrie aangeraden om melamine en mogelijke fraude met niet-proteïne stikstof als potentieel gevaar op te nemen in hun autocontrolesysteem.

Summary

Advice 06-2009 of the Scientific Committee of the FASFC on melamine in milk for infant formulas

Due to adulteration of milk and milk powder with melamine, more than 51,900 Chinese infants and young children were hospitalized and at least six infants died. Melamine is a chemical that is used in the manufacture of plastics, coatings, flame retardants, resins and adhesives. Melamine, which is not carcinogenic, genotoxic or teratogenic, can however, cause the formation of kidney stones or even kidney failure after prolonged exposure.

Based on the available data it is possible to fix an action limit (maximum concentration). Nevertheless, it should be noted that many lacunas remain, particularly regarding the toxicological properties of melamine (and analogues) e.g. regarding long-term exposure of children. The Scientific Committee wishes furthermore to emphasize that concentrations of potential contaminants in infant formulas should always be as low as reasonably achievable. The consumer is advised to stick to recognized brands of infant formulas, as their composition must comply with regulatory standards.

Additionally it is noted that the problem can drag on for a long time given the incident concerns products with a prolonged shelf life (milk powder, etc.). The industry is

recommended to include melamine and possible fraud with non-protein nitrogen as a potential hazard in their self-control system.

Sleutelwoorden

melamine, melk, zuigelingenvoeding, risico-evaluatie

1. Referentietermen

1.1. Vraagstelling

Er wordt aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd een risico-evaluatie uit te voeren m.b.t. de aanwezigheid van melamine in melk voor (opvolg)zuigelingenvoeding.

1.2. Wettelijke context

Koninklijk Besluit van 19 december 2008 inzake speciale voorwaarden voor de invoer van producten die melk, melkproducten, soja, sojaproducten of ammoniumbicarbonaat bevatten, van oorsprong uit of verzonden uit China;

Koninklijk Besluit van 18 februari 1991 betreffende voedingsmiddelen bestemd voor bijzondere voeding;

Koninklijk Besluit van 11 mei 1992 betreffende materialen en voorwerpen bestemd om met voedingsmiddelen in aanraking te komen;

Overwegende de besprekingen tijdens de werkgroepvergaderingen van 1 december 2008 en 16 januari 2009, en de plenaire zitting van 13 maart 2009;

geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies :

2. Inleiding

In het najaar van 2008 werden in China meer dan 51.900 zuigelingen en jonge kinderen in het ziekenhuis opgenomen en overleden ten minste zes baby's ten gevolge van urinaire problemen, waaronder nierfalen en de vorming van nierstenen. Deze voor jonge kinderen zeldzame aandoening werd in verband gebracht met de consumptie van met melamine gecontamineerde zuigelingenvoeding en aanverwante zuivelproducten (Langman, 2009; Na *et al.*, 2009; WHO, 2008). Naast zuigelingenvoeding en melk, werd melamine eveneens aangetroffen in bevroren yoghurtdesserten, koekjes, snoepjes en koffiedranken, producten die vermoedelijk vervaardigd werden met ingrediënten op basis van met melamine gecontamineerde melk.

Melamine bleek doelbewust toegevoegd te zijn om een hoger proteïnegehalte te veinzen. Melamine bevat veel stikstof en de meest gangbare wijze in de voedingsindustrie om het proteïnegehalte te meten is namelijk m.b.v. een stikstoffest.¹ De fraude lijkt uitgevoerd te zijn tijdens de primaire productie van melk, in de stations voor melkcollectie (WHO, 2008).

In 2007 vond in de VS, Canada en Zuid-Afrika een gelijkaardig melamine incident plaats met voeders voor gezelschapsdieren. De contaminatie werd getraceerd naar uit China afkomstige tarwe- en maïsgluten en rijsteiwitconcentraat. Meerdere honden en katten stierven ten gevolge van nierfalen waarbij mogelijk de combinatie van melamine en cyanuurzuur verantwoordelijk zou geweest zijn voor de waargenomen toxiciteit (Dobson *et al.*, 2008; EFSA, 2007; FDA, 2007). De melamine waarmee de melk in China gecontamineerd werd, zou relatief weinig onzuiverheden bevat hebben met gehalten aan de melamine analogen cyanuurzuur, ammeline en ammelide lager dan 0,1% van het gedetecteerde melaminegehalte. Dit is veel lager is dan het gehalte aan analogen dat aangetroffen werd in de gecontamineerde diervoeders van het 2007 melamine incident (WHO, 2008). Op basis van de tot op heden beschikbare gegevens, blijkt dat de Chinese zuigelingen vnl. werden blootgesteld aan melamine alleen of aan melamine met sporen van cyanuurzuur, terwijl de huisdieren werden blootgesteld aan melamine en cyanuurzuur samen, en mogelijk ook aan

¹ bv. de methode van Kjeldahl

ammeline en ammelide. De getroffen zuigelingen ontwikkelden stenen in de urinewegen, terwijl de huisdieren kristallen ontwikkelden in de niertubuli, gevolgd door obstructieve nefropathie. De huisdieren werden door hoge blootstelling binnen 2 dagen getroffen door acuut nierfalen, terwijl de meeste zuigelingen met nierstenen geen openlijke klinische symptomen vertoonden (Langman, 2009; Na *et al.*, 2009; WHO, 2008).

In het kader van het melamine melkincident werden door de Europese Commissie enkele vrijwaringsmaatregelen getroffen die opgenomen zijn in de Beschikking van de Commissie van 14 oktober 2008 houdende speciale voorwaarden voor de invoer van producten die melk of melkproducten bevatten van oorsprong uit of verzonden uit China en tot intrekking van Beschikking 2008/757/EG (2008/798/EG), omgezet in het KB van 19 december 2008. Het volgende wordt gesteld:

- De invoer van melk en melkproducten, incl. melkpoeder, en van samengestelde producten die specifiek bedoeld zijn als voeding voor zuigelingen of jonge kinderen van oorsprong uit China, is niet toegestaan
- Andere samengestelde producten (zoals koekjes en chocolade), die slechts een gering deel van een gevarieerde voeding vertegenwoordigen, en die ten minste 15 % melkproducten bevatten, worden systematisch getest bij invoer. Dergelijke producten worden onmiddellijk vernietigd wanneer zij meer dan 2,5 mg/kg melamine blijken te bevatten.

Voor melk en melkproducten, incl. melkpoeder, en van samengestelde producten die specifiek bedoeld zijn als voeding voor zuigelingen of jonge kinderen is het moeilijk om een actielimiet (maximaal gehalte) vast te leggen o.m. omdat die producten gedurende een vrij lange periode de enige voedingsbron voor zuigelingen zijn. Sommige derde landen eisen evenwel een attest dat bevestigt dat deze producten geen melamine bevatten.

Het is in deze context dat aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd wordt een risicoevaluatie uit te voeren m.b.t. de aanwezigheid van melamine in melk voor (opvolg)zuigelingenvoeding.

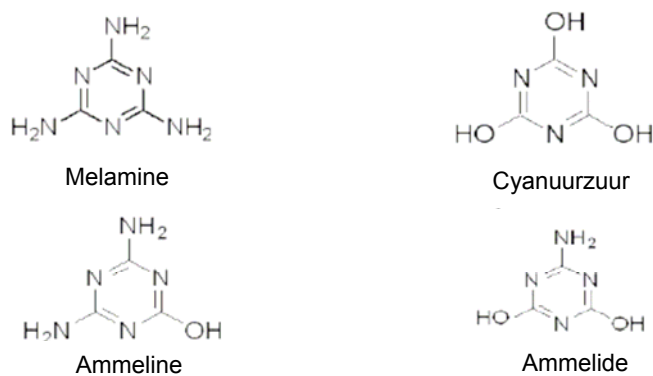
3. Risico-evaluatie

3.1. Gevarenidentificatie

3.1.1. Technische data

Melamine (CAS nr. 108-78-1) is licht wateroplosbaar en onoplosbaar in ether. De oplosbaarheid van melamine in water bedraagt 3,2 g/l, van cyanuurzuur 2,0 g/l en van het melamine-cyanuraatcomplex 0,002 g/l (20°C) (Dobson *et al.*, 2008; ECB, 2000).

De dissociatie constante (pKa) voor melamine en cyanuurzuur bedraagt respectievelijk 5,35 en 4,74 (25°C) (FDA, 2007).



Figuur 1. Structuur van melamine en analogen

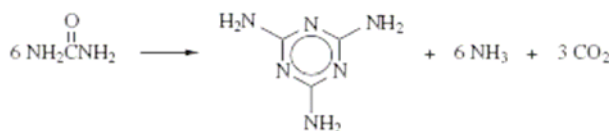
Melamine (1,3,5-triazine-2,4,6-triamine) kan door bacteriële hydrolyse via drie opeenvolgende deaminatie reacties afgebroken worden tot de analogen ammeline (4,6-diamino-2-hydroxy-1,3,5-triazine, CAS nr. 645-92-1), ammelide (6-amino-2,4-dihydroxyl-3,5-triazine, CAS nr. 645-93-2) en cyaanuurzuur (1,3,5-triazine-2,4,6-triol in evenwicht met -afhankelijk van de pH-de trion vorm, CAS nr. 108-80-5) (WHO, 2008; EFSA, 2007; ECB, 2000) (Figuur 1).

Analysemethode

Het gehalte aan melamine en analogen kan gemeten worden m.b.v. ELISA, HPLC-UV, GC-MS(MS), LC-MS(MS).² Recent werden verschillende, snelle analysemethoden ontwikkeld, met een kwantificatielimit tot ongeveer 50 µg/kg. Een niet-exhaustief en informatief overzicht wordt gegeven op de website van de WHO (2008).

3.1.2. Synthese van melamine

Melamine werd oorspronkelijk geproduceerd vanaf calciumcarbide (uit steenkool en kalksteen), dat via calciumcyaanamide geconverteerd wordt naar dicyaandiamide. Door verhitting van dit laatste boven zijn smeltemperatuur wordt melamine gevormd. Tegenwoordig vertrekken de meeste producenten van ureum om melamine te produceren, waarbij gesmolten ureum bij 400°C in een 1-stapskatalysereactie trimeriseert tot melamine met vrijstelling van ammoniak en CO₂ (Figuur 2). Het proces kan zowel bij lage (gasfase) als bij hoge druk (vloeistoffase) uitgevoerd worden. In het laatste geval wordt cyaanuurzuur (HOCN) als intermediair product gevormd (Kirk-Othmer, 2004; Wittcof *et al.*, 2004; ECB, 2000). Bij het uitkristalliseren en het wassen van melamine wordt een aanzienlijke hoeveelheid afvalwater geproduceerd dat naast melamine ook oxyaminotriazines (ammeline, ammelide), cyaanuurzuur en polycondensaten (melem, melam en melon) kan bevatten. Deze stoffen kunnen via verdamping, filtratie, flocculatie en coagulatie, quasi volledig teruggewonnen worden en in harsen omgezet worden (Lahali & Absi-Halabi, 1989).



Figuur 2. Synthese van melamine (Kirk-Othmer, 2004).

3.1.3. Toepassingen / Voorkomen

Melamine wordt gebruikt bij de fabricage van onder meer plastics, coatings, vlamvertragers, harsen en lijm. Melamine is sterk, licht, hard en bestand tegen zuren en basen, waardoor het toegepast wordt voor de productie van o.a. borden en bestek, en als hoofdbestanddeel van de toplaag van formica en laminaatvloeren. Melamine komt eveneens voor in brandblusmiddelen (in een bepaalde verhouding met cyaanuurzuur) en is een belangrijke metaboliet van cyromazine, een insecticide (EMEA, 2001; ECB, 2000; EPA, 1999).

Cyanuurzuur is een structurele analoog van melamine en kan worden aangetroffen als onzuiverheid van melamine. Cyanuurzuur wordt door de Amerikaanse 'Food and Drug Administration' (FDA) toegelaten als component van een voederadditief voor herkauwers. Blootstelling aan cyaanuurzuur is mogelijk via met dichloroisocyanuraat gedesinfecteerd zwemwater, via gedesinfecteerd drinkwater³ dat van oppervlaktewater afkomstig is, en via vis, waarin cyaanuurzuur kan accumuleren (WHO, 2008).

3.1.3 Toxiciteit

² ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; GC: Gas Chromatography; HPLC: High-Pressure Liquid Chromatography; LC: Liquid Chromatography; MS: Mass Spectrometry; UV: Ultraviolet

³ niet onmiddellijk relevant voor België

Melamine wordt door het 'International Agency for Research on Cancer' (IARC) geclassificeerd in Groep 3 (onvoldoende bewijs van de cancerogeniteit van melamine bij mensen) (IARC, 1999). Melamine is niet genotoxisch, carcinogeen of teratogeen.

Er werden verschillende dierproeven uitgevoerd, met inbegrip van kanker biotesten, waarbij melamine herhaaldelijk oraal werd toegediend bij muizen, ratten en honden. De belangrijkste doelorganen die geïdentificeerd werden bij subchronische en chronische experimenten, blijken de blaas en de nieren te zijn. In kanker biotesten bij F344/N ratten, werden transitie-cel carcinomen van de urineblaas waargenomen bij hoge dosis bij de mannetjes (4500 ppm, equivalent aan 263 mg/kg lg per dag) en papillomen in de urineblaas bij de vrouwtjes (1 in de 4500 ppm groep en 1 in de 9000 ppm groep), samen met tekenen van chronische nierontsteking (NTP, 1983). De NOAEL ('No Observed Adverse Effect Level') voor de mannetjes bedroeg 2250 ppm, equivalent aan 126 mg/kg lg per dag. Voor de vrouwtjes kon geen NOAEL bepaald worden, en bedroeg de LOAEL ('Lowest Observed Effect Level') van 4500 ppm, equivalent aan 262 mg/kg lg per dag. Een TD₅₀⁴ van 735 mg/kg lg per dag werd geschat (Gold *et al.*, 1989). Bijkomende observaties zijn de ontwikkeling van blaasstenen (calculi) en hyperplastische epitheelveranderingen van de urineblaas. Er werden geen significante neoplastische effecten waargenomen bij vrouwelijke ratten of B6C3F1 muizen van beide geslachten. Bij mannelijke muizen werden behandelingsgerelateerde toenames waargenomen van de incidentie van calculi in de urineblaas, van acute en chronische urineblaasontsteking en van epitheliale hyperplasie van de blaas bij dosissen van 2250 en 4500 ppm. Deze drie fenomenen werden eveneens in 4 van de 50 vrouwelijke muizen waargenomen bij de hoogste dosis van 4500 ppm. Voor de mannetjes kon geen NOAEL worden vastgesteld, en bedroeg de LOAEL 2250 ppm, equivalent aan 327 mg/kg lg per dag. De NOAEL voor vrouwtjes was 2250 ppm, equivalent aan 523 mg/kg lg per dag.

Er bleek een significante correlatie te zijn tussen de ontwikkeling van blaastumoren bij mannelijke ratten en de vorming van calculi. Latere studies met kunstmatig geïnduceerde polyurie (toevoeging van NaCl aan het dieet met meerdere urinelozingen tot gevolg) toonden aan dat de beperking van calculivorming resulteert in minder proliferatieve laesies van de blaas en een lagere tumorincidentie (Ogasawara *et al.*, 1995). Aangezien bijkomende studies hebben aangetoond dat melamine geen initiator is van tumoren en niet mutageen of genotoxisch is in een breed scala van *in vitro* en *in vivo* testen, wordt het mechanisme van tumorvorming in de blaas als niet-genotoxisch of epigenetisch beschouwd (Health Canada, 2008a).

Er zijn veel gegevens m.b.t. de toxiciteit van de blootstelling aan melamine of cyaanuurzuur afzonderlijk, maar toxicologische gegevens over de gecombineerde blootstelling aan melamine en cyaanuurzuur zijn zeer beperkt (onder andere m.b.t. de toegediende dosissen en het aantal proefdieren), en gelimiteerd tot vissen (Reimschuessel *et al.*, 2008), varkens (Reimschuessel *et al.*, 2008), katten (Puschner *et al.*, 2007) en ratten (Dobson *et al.*, 2008). In al deze dierproeven werd acute, renale toxiciteit waargenomen, met vorming van tubuli-belemmerende kristallijne structuren (zie verder).

De belangrijkste symptomen die gemeld werden voor de zuigelingen die blootgesteld werden aan met melamine gecontamineerde zuigelingenvoeding, betroffen voornamelijk defecten aan de nieren van uiteenlopende ernst (nierstenen, -verstopping, -insufficiëntie, -verzuim). Echter, in de voedingsexperimenten met melamine bleken de belangrijkste effecten blaasgerelateerd te zijn (blaasstenen, hyperplasie van het epitheel, tumoren), ofschoon er een aantal indicaties van niertoxiciteit werden waargenomen bij ratten (chronische ontsteking, fibrose). Deze schijnbare discrepantie tussen soorten kan het gevolg zijn van een aantal factoren, waaronder functionele en/of anatomische verschillen tussen de nieren van de rat en van de mens, renale klaringscapaciteit, het ontwikkelingsstadium of de aanwezigheid van andere contaminanten (Health Canada, 2008a).

Metabolisatie

De beschikbare gegevens wijzen erop dat melamine vrij snel en ongewijzigd via de urine wordt uitgescheiden met een halfwaardetijd van ongeveer 3 uur in het plasma (OECD, 1998;

⁴ dosis die een toxisch effect veroorzaakt bij 50% van de proefdieren

EFSA, 2007). In een risico-evaluatie uitgevoerd door het Amerikaanse levens- en geneesmiddelenagentschap FDA wordt aangenomen dat accumulatie in voor consumptie bestemde weefsels van dieren (varken, kip en vis) die gecontamineerd voeder kregen (aan de tijdens het 2007 melamine incident gerapporteerde concentraties), weinig waarschijnlijk is (FDA, 2007). Bovendien bleek aan de hand van farmacokinetische studies waarbij melamine intraveneus geïnjecteerd werd, dat melamine snel en volledig uitgescheiden wordt door de nieren met een halfwaardetijd ($T_{1/2}$) van 4 uur bij varkens en van 2,7 uur bij ratten. Er werd geen significante binding aan weefsels of retentie in het lichaam geobserveerd (Baynes *et al.*, 2008).

M.b.t. cyanuurzuur, wordt er meer dan 98% van een oraal toegediende dosis bij de mens binnen de 24 uur onveranderd uitgescheiden via de urine (Allen *et al.*, 1982 geciteerd door WHO, 2008)

Daarentegen zijn er aanwijzingen van melamine in dierlijk weefsel (inclusief vis), melk en eieren, wat wijst op een overdracht van diervoeder naar voor de menselijke consumptie bestemde dierlijke weefsels, melk en eieren. Het Franse "Agence française de Sécurité Sanitaire des Aliments" (AFSSA) bracht in dit verband een advies uit m.b.t. de overdracht van melamine naar levensmiddelen van vleeskuikens en leghennen (AFSSA, 2008b). Via het systeem van autocontrole werd door een operator melamine in uit China afkomstige sojakoek aangetroffen, en dit aan concentraties van 116 en 400 mg/kg. Deze sojakoeken waren als voeder bestemd voor vleeskuikens en leghennen, met maximaal 10% vermenging in samengestelde voeders. In vier stalen van de samengestelde voeders werden melaminegehalten van 70 mg/kg aangetroffen. Het vlees en de eieren van het pluimvee dat deze sojakoek gevoerd kregen, bleken evenwel geen sporen van melamine te bevatten. Ook in de literatuur werd niet onmiddellijk een statistische correlaties weergevonden tussen de blootstelling aan melamine en de aanwezigheid van residuen in levensmiddelen van dierlijke oorsprong. Hoewel varkens en pluimvee vergelijkbaar zijn in termen van voedingsgewoonten, zijn er wel verschillen in de excretie van stikstof tussen zoogdieren en vogels (AFSSA, 2008b).

Voor wat de in Hong Kong gerapporteerde detectie van melamine in eieren betreft (2,9; 3,1 en 4,7 mg/kg), verwijst het AFSSA naar cyromazine als mogelijke bron van besmetting (AFSSA, 2008 a&b). Ongeveer 10% van cyromazine metaboliseert *in vivo* in melamine. Cyromazine wordt gebruikt als pesticide, als larvicide bij pluimvee (in Europa opgenomen in pluimveevoeder tot 2005), en als biocide voor insectencontrole bij huisdieren (AFSSA, 2008b).

Momenteel is het t.g.v. inconsistenties in een beperkt aantal gegevens nog niet mogelijk een goede schatting van een voeder-weefsel (melk, eieren) overdrachtsratio te maken (WHO, 2008).

Accumulatie van melamine in de nieren: vorming van nierstenen

In het 2007 melamine incident met diervoeders voor gezelschapsdieren, werd de aanwezigheid van structureel verwante triazinecontaminanten, namelijk ammeline, ammelide en cyanuurzuur, aangetoond. Kortetermijn voederexperimenten met katten toonden aan dat, terwijl melamine en cyanuurzuur afzonderlijk geen nierdefecten veroorzaken, een gecombineerde toediening wel resulteert in de vorming van kristallen en laesies in het nierweefsel, en klinische tekenen van nierschade (Puschner *et al.*, 2007). Gelijkaardige observaties van kristalvorming in de nieren en nierschade werden waargenomen in experimenten waarbij varkens en vis via het voeder blootgesteld werden aan gecombineerde dosissen van melamine en cyanuurzuur (Reimschuessel *et al.*, 2008). Bovendien bleek uit acute orale toedieningsstudies bij ratten dat mengsels van melamine en cyanuurzuur, of van melamine en de drie eerder genoemde triazine contaminanten, nierkristallen en nierschade veroorzaken (Dobson *et al.*, 2008).

Ondanks de snelle excretie van melamine via de urine, kan, wanneer voldoende hoge concentraties aanwezig zijn, melamine accumuleren in de nieren (de $T_{1/2}$ in de nieren kan 7 maal groter zijn dan in het plasma) (Baynes *et al.*, 2008; WHO, 2008). Er wordt verondersteld dat melamine (en cyanuurzuur) bij inname geabsorbeerd wordt in het spijsverteringskanaal, systematisch gedistribueerd wordt en, om redenen die nog niet volledig gekend zijn, neerslaat in de niertubuli wanneer de urine verzadigd is, wat leidt tot kristalvorming, verstopping en progressieve tubulaire degeneratie (Dobson *et al.*, 2008). Op lange termijn, kunnen de kristallen nierstenen, verzwering van het slijmvlies, ontstekingen en tumoren veroorzaken. Uit

dierproeven bleek dat de kristaldepositie zich vnl. voordoet in de distale tubuli en verzamelkanalen van de nieren (Baynes *et al.*, 2008).

Melamine kan via intramoleculaire netwerken van waterstofbruggen en π - π interacties tussen de aromatische ringen associëren tot hoog moleculaire complexen met cyaanuurzuur en andere analogen, alsook met urinezuur en andere cyclische imide-bevattende biomoleculen (Dobson *et al.*, 2008; WHO, 2008). De wateroplosbaarheid van melamine bedraagt 3240 mg/l en die van cyaanuurzuur 2000 mg/l. Echter, melamine en cyaanuurzuur vormen samen een zeer geordende roosterstructuur waaraan andere melamine derivaten kunnen bijdragen met ammeline als substituuut voor melamine en ammelide voor cyaanuurzuur. De oplosbaarheid van het melamine-cyanuraatcomplex bedraagt slechts 2,2 mg/l (Dobson *et al.*, 2008). Voor wat het Chinese melkincident betreft, blijkt uit de beperkte gegevens dat de nierstenen zijn samengesteld uit urinezuur en melamine in een molaire verhouding variërend van 1,2:1 tot 2,1:1, zonder indicaties voor de aanwezigheid van cyaanuurzuur of andere melamine analogen (WHO, 2008).

Toxicologische onzekerheden

Er zijn nog een aantal onzekerheden m.b.t. de toxiciteit van melamine / melaminemengsels (i.e. melamine + analogen), waaronder de extrapolatie van het voorgestelde mechanisme voor nierbeschadiging bij dieren naar de mens, en de mogelijke speciesverschillen omtrent de farmacokinetiek of de gevoeligheid voor de toxische effecten van melaminemengsels. De dosis-respons relatie en de toxische drempeldosis voor melaminemengsels zullen hoogst waarschijnlijk verschillen van species tot species en dienen bestudeerd te worden.

3.2. Gevarenkarakterisatie

Het 'Scientific Committee on Food' (SCF) leidde voor melamine een TDI ('Tolerable Daily Intake' of toelaatbare dagelijkse inname) af van 0,5 mg/kg lg per dag voor materialen in contact met levensmiddelen. Details over de bepaling van deze TDI worden niet gegeven (EFSA, 2007, 2008).

De FDA beveelt een gelijkaardige TDI van 0,63 mg/kg lg per dag aan voor voedingsmiddelen en -ingrediënten (excl. zuigelingenvoeding) (FDA, 2008). Deze TDI is gebaseerd op een NOAEL die bepaald werd a.h.v. inductie van urolithiase bij F344 mannelijke ratten die gedurende 13 weken via het voeder blootgesteld werden aan melamine (63-1500 mg/kg lg per dag) (Melnick *et al.*, 1984), en een onzekerheidsfactor van 100.

Health Canada beveelt voor voedingsmiddelen die melk en van melk afgeleide ingrediënten bevatten, een lagere toxicologische referentie dosis (TRD) van 0,35 mg melamine / kg lg per dag aan (Health Canada, 2008a). Deze is gebaseerd op 'benchmark' dosis analyse (10% respons) voor de vorming van urolithiase en de incidentie van hyperplasie van het blaasepitheel bij subchronische orale blootstellingsexperimenten via de voeding, waarbij een BMDL₁₀ ('benchmark dose low level') van respectievelijk 35 en 104 mg/kg lg per dag gegenereerd werd. Aangezien de vorming van blaasstenen beschouwd wordt als precursor voor mogelijke tumorontwikkeling, wordt 35 mg/kg lg per dag aanbevolen als geschikte toxicologische referentie.

M.b.t. natriumcyanuraat werd een NOAEL van 154 mg/kg lg per dag vastgesteld in een 2-jaar durende studie bij ratten, op basis waarvan en met toepassing van een onzekerheidsfactor van 100 een TDI van 1,5 mg/kg lg per dag wordt aanbevolen (EFSA, 2007).

Er zijn geen literatuurgegevens bekend m.b.t. de toxiciteit van ammeline of ammelide bij dieren of mensen (EFSA, 2007). Het EFSA adviseert een TDI van 0,5 mg/kg lg per dag voor het totaal aan melamine en analogen (ammeline, ammelide, cyaanuurzuur) (EFSA 2007, 2008).

In december 2008, werd door de Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO) in samenwerking met de Voedsel-en Landbouworganisatie van de Verenigde Naties (FAO) een TDI van 0,2 mg/kg lg per dag aanbevolen voor melamine, en dit op basis van een BMDL₁₀ van 35 mg/kg lg per dag en een onzekerheidsfactor van 200 (WHO, 2008). Uitgaande van deze TDI zou 10 mg melamine per dag aanvaardbaar zijn voor een persoon van 50 kg. De TDI werd bepaald op basis van toxicologische studies op spenende ratten, waarbij een extra onzekerheidsfactor toegepast werd om rekening te houden met een aantal onzekerheden in de dataset. De TDI

is bijgevolg van toepassing op de hele bevolking, met inbegrip van zuigelingen. Deze TDI geldt enkel voor melamine. De TDI voor cyanuurzuur van 1,5 mg/kg lg blijft behouden. De toxiciteit van melamine en cyanuurzuur samen is vermoedelijk hoger dan de toxiciteit van de stoffen afzonderlijk. Totnogtoe zijn er evenwel onvoldoende data beschikbaar om gezondheidsgerelateerde richtlijnen voor dergelijke co-blootstelling te bepalen.

Tabel 1. Overzicht van aanbevolen TDI/RTD waarden.

Melamine	mg/kg lg per dag
EFSA (2007, 2008)	0,5
FDA (2008)	0,63
Health Canada (2008a)	0,35
WHO (2008)	0,2
Cyanuurzuur	
EFSA (2007), WHO (2008)	1,5
Melamine + analogen	
EFSA (2007)	0,5

3. Blootstellingschatting

In wat volgt, wordt een overzicht gegeven van mogelijke bronnen voor potentiële blootstelling aan melamine en wordt de blootstelling aan melamine via frauduleuze toevoeging aan voedingsmiddelen besproken. Het Wetenschappelijk Comité meent dat op basis van de beschikbare gegevens het schatten van de blootstelling van de Belgische bevolking en in het bijzonder van jonge kinderen, geen meerwaarde biedt. Namelijk, tot op heden werden er in België hoegenaamd geen met melamine besmette producten in de winkelrekken aangetroffen en kan voor de schatting van de blootstelling enkel een onrealistisch, 'worstcase' scenario uitgewerkt worden. Bovendien is de invoer van uit China afkomstige melk- en aanverwante producten, evenals van eieren verboden. Tot slot wordt verwezen naar een aantal internationaal uitgevoerde blootstellingsstudies (zie 3.3.3.)

3.3.1. Mogelijke bronnen van blootstelling

Naast frauduleuze toevoeging van melamine om kunstmatig het proteïnegehalte te verhogen, kunnen in het milieu en de voedselketen sporen van melamine aanwezig zijn ten gevolge van het wijdverspreide gebruik van melamine, bv. in contactmaterialen en pesticiden. Daarnaast kunnen melamine en de analogen ook in het milieu terecht komen via bv. afvalwater afkomstig van industriële toepassingen of de productie van melamine. Gegevens hierover zijn evenwel niet beschikbaar (WHO, 2008).

De blootstelling aan melamine t.g.v. contaminatie van levensmiddelen via pesticiden is vermoedelijk te verwaarlozen. In België is het gebruik van cyromazine (handelsmiddel : Trigard, 100 g/l) erkend in de sierteelt en voor een aantal groententeelten (andijvie, radicchio rosso, suikerbrood, veldsla, tomaten, slasoorten, bleekselder, ruccola), en specifiek gericht tegen de larven van mineervliegen.⁵

Trichloromelamine⁶ is in de VS toegelaten als ontsmettingsmiddel/schoonmaakmiddel van procesapparatuur in de levensmiddelenindustrie, met uitzondering van melk (FDA, 2008). Tijdens het gebruik kan trichloromelamine gemakkelijk ontbinden tot melamine. Er wordt aangenomen dat slechts sporen van melamine via deze toepassing in de voeding terecht zouden komen (FDA, 2008).

Migratie van melamine uit kookgerei (bv. harde, plastieken bekens) doet zich vnl. voor in geval van zure voedingsmiddelen (pH 2-5) bij hoge temperatuur. Zo werden in citroen- en appelsiensap, evenals in koffie en gestremde melk melaminegehalten tussen 0,54 en 2,21 mg/kg gedetecteerd (na 30 min bij 95°C) (ECB, 2000). Andere wetenschappelijke studies

⁵ Fytoweb (<http://www.fytoweb.fgov.be/indexNL.asp>), geraadpleegd november 2008.

⁶ M.b.t. België: trichloromelamine komt niet voor in de lijst met toegelaten werkzame stoffen

m.b.t. de migratie van melamine uit kookgerei zijn o.m. Lund & Petersen (2006) en Bradley *et al.* (2005). Daarnaast kunnen sporen van melamine migreren vanuit procesapparatuur tijdens de industriële verwerking en transformatie van levensmiddelen. Afhankelijk van de referentie, wordt de hoeveelheid melamine die via contactmaterialen in de voeding terecht komt, geschat op ongeveer 7 µg/kg (OECD, 1998) tot minder dan 15 µg/kg (FDA, 2008) per dag.

3.3.2. Blootstelling van jonge kinderen via gecontamineerde melk

Doelgroep & relevante producten

Zuigelingen en peuters zijn een heel gevoelige doelgroep. Bovendien dient bij de risico-evaluatie rekening gehouden te worden met de extra gevoelige groep van te vroeg geboren baby's (prematuren) die eveneens met zuigelingenformules gevoed worden, maar waarvan de nieren nog niet volledig ontwikkeld zijn.

Het KB van 18 februari 1991 geeft volgende definities:

- zuigelingen: kinderen jonger dan twaalf maanden;
- kleuters: kinderen van één tot drie jaar oud;

en geeft onder meer specificaties over:

- volledige zuigelingenvoeding: voedingsmiddelen die speciaal zijn bedoeld om als voeding voor zuigelingen in de eerste levensmaanden te worden gebruikt, en die zolang nog geen passende aanvullende voeding wordt gegeven, volledig aan de voedingsbehoeften van deze zuigelingen voldoen;
- opvolgzuigelingenvoeding: voedingsmiddelen die speciaal zijn bedoeld om als voeding voor zuigelingen te worden gebruikt wanneer passende aanvullende voeding wordt gegeven en die het belangrijkste vloeibare bestanddeel vormen van de steeds gevarieerder wordende voeding van deze zuigelingen.
- bewerkte voedingsmiddelen op basis van granen: bewerkte voedingsmiddelen op basis van granen en/of van wortelproducten, die in de specifieke behoeften voorzien van in goede gezondheid verkerende zuigelingen en kleuters, die zijn bedoeld om te worden verbruikt door zuigelingen tijdens de periode waarin ze worden gespeend en door kleuters om hun voeding aan te vullen en/of hen geleidelijk aan gewoon voedsel te laten wennen.
- babyvoeding: voedingsmiddelen die in de specifieke behoeften voorzien van in goede gezondheid verkerende zuigelingen en kleuters, die zijn bedoeld om te worden verbruikt door zuigelingen tijdens de periode waarin ze worden gespeend en door kleuters om hun voeding aan te vullen en/of hen geleidelijk aan gewoon voedsel te laten wennen, met uitzondering van bewerkte voedingsmiddelen op basis van granen en voor peuters bestemde melk- en sojadranken.

Naast melk(poeder) zijn ook soja (dat gebruikt wordt als hypoallergeen vervangmiddel voor melk in (opvolg)zuigelingenvoeding), graanproducten en ammoniumbicarbonaat (dat wordt gebruikt als rijsmiddel in koekjes en gebak, maar ook in babyvoeding en voedingsmiddelen op basis van granen voor baby's en jonge kinderen) belangrijke ingrediënten voor (opvolg)zuigelingenvoeding, waarmee rekening gehouden dient te worden in het kader van de melamine problematiek.

Melaminegehalten in gecontamineerde producten

M.b.t. het achtergrondgehalte van melamine dat via contactmaterialen en pesticiden in voedingsmiddelen terecht kan komen, zijn maar een beperkt aantal gegevens uit de voedingsindustrie voorhanden (zie 3.3.1.). Wanneer dergelijke melaminegehalten gerapporteerd worden, wordt veelal niet de detectie- of kwantificatielimiet (LOD, 'limit of detection' of LOQ, 'limit of quantification') voor de analysemethode vermeld, maar eerder een rapporteringslimiet (LOR, 'limit of reporting'). Deze LOR kadert in een screening naar melamine in producten, die uitgevoerd wordt voor risicobeheersdoeleinden (1,0 en 2,5 mg/kg). Zo werden door een bekende producent van zuigelingenvoeding op vraag van het Agentschap melaminegehalten beneden 0,05 mg/kg voor 98% van de producten gerapporteerd. Voor de overige 2% bedroeg het melaminegehalte lager dan 1 mg/kg (n ≥ 400) (interne communicatie).

De Chinese AQSIQ ('Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine') meldde in het kader van het melkincident melaminegehaltenes tussen 0,09 tot 6196,61 mg/kg in zuivelproducten (incl. zuigelingenvoeding). Derde landen rapporteerden gehaltenes in producten van Chinese makelij variërend van 0,38 tot 945,86 mg/kg voor zuivelproducten en van 0,6 tot 6694 mg/kg voor verwerkte voedingsmiddelen en voedingsingrediënten (WHO, 2008).

In voedingsingrediënten voor de verwerkende industrie (bv. eigeel, eiwitpoeder, ...) werden gehaltenes variërend van 0,1 tot 5,03 mg/kg aangetroffen. Voor in China geproduceerde, verse eieren werden melamineconcentraties tussen 2,9 en 4,7 mg/kg gemeld. Melamine werd eveneens gedetecteerd in ammoniumbicarbonaat, voor sommige monsters aan een concentratie hoger dan 2000 mg/kg (Taiwan) (AFSSA, 2008a).

M.b.t. Europa, wordt in onderstaande tabel een overzicht gegeven van de via het RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) gerapporteerde melaminegehaltenes in gecontamineerde voedingsproducten (oktober 2008 – januari 2009).

Tabel 2. Via RASFF gerapporteerde melaminegehaltenes in gecontamineerde voedingsproducten (afkomstig uit China).

Voedingsmiddel	[Melamine] mg/kg
<i>Melk en melkproducten</i>	
melk en yoghurt	7 - 22
melkdrank	14,4- 25,6
melkproducten	162
<i>Voedingsadditieven</i>	
ammoniumbicarbonaat	81 - 460,6
<i>Voedingssupplementen</i>	
soja isoflavonen voor voedingssupplementen	8,3
<i>Snacks & snoepgoed</i>	
romige (gearomatiseerde) snoepjes	3,3 - 209
chocoladeproducten	15 – 46,2
sojasnack	3,79 - 5,4
frietten	5 - 30
chips	3
gearomatiseerde koekjes	<0,1 - 11
chocoladesnack	7,8
<i>Graan- en bakkerijproducten</i>	
zoutstokjes	3,5
melkkoekjes	9,9
chocoladetaart	4,02 - 7,4
koekjes (noten-, chocolade- & gearomatiseerde)	3,1 - 57
cracker (citroen-, pinda-, BQQ-)	11,1 – 19,9
<i>Diervoeder</i>	
viskoekjes met kaassmaak	6,3
voeder voor siervissen	81,4
biologische soja	1,6 - 220
rijstproteïneconcentraat	21000
sojameel	116,2 - 797

Op de Belgische markt werden hoegenaamd geen met melamine gecontamineerde voedingsproducten aangetroffen.⁷ Bovendien is de import van Chinese melkproducten⁸ alsook de invoer van voor menselijke consumptie bestemde verse eieren uit China verboden.⁹ Evenwel, melamineblootstelling via verse eieren zou onrechtstreeks mogelijk zijn via het gebruik van eieren/eiproducten als voedingsingrediënten in verwerkte producten.

⁷ zie website FAVV: <http://www.favv-afsc.fgov.be/levensmiddelen/melamine/>

⁸ KB van 19 december 2008

⁹ Beschikking van de Commissie van 6 oktober 2005 betreffende bepaalde beschermingsmaatregelen in verband met aviaire influenza in verscheidene derde landen (2005/692/EG)

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:263:0020:0021:NL:PDF>

3.3.3. Blootstellingsschattingen vermeld in de literatuur

De Werelgezondheidsorganisatie (WHO)

De hoeveelheid melamine waaraan de zuigelingen in China werden blootgesteld via de consumptie van met melamine gecontamineerde zuigelingenvoeding wordt, op basis van de mediane melamineconcentraties die gemeten werden in de meest verontreinigde producten, geschat op 8,6-23,4 mg/kg lg per dag. De blootstelling van volwassenen via voedingsmiddelen (met uitzondering van zuigelingenvoeding) die gecontamineerde melkpoeder kunnen bevatten, wordt op basis van Europese voedselconsumptiegegevens op 0,16-0,7 mg/kg lg per dag geschat. Hierbij wordt verondersteld dat melamine aanwezig is in alle voedingsmiddelengroepen en dit aan het hoogste niveau dat gerapporteerd werd voor een levensmiddel uit die groep (WHO, 2008).

Het Europese Voedselagentschap (EFSA)

De Europese Autoriteit voor de voedselveiligheid (EFSA) publiceerde een kwantitatieve risico-evaluatie in september 2008. De evaluatie was gebaseerd op de consumptie van koekjes en snoepgoed (melktoffee's, chocolade), en diverse contaminatiescenario's, waaronder een 'worstcase' scenario waarbij uitgegaan werd van het op dat moment hoogst vermelde melaminecontaminatieniveau in China van 2563 mg/kg. Op basis van de evaluatie bleek er voor een gemiddelde consument geen risico's te zijn, en dit voor zowel volwassenen als kinderen. Er zou wel een risico tot overschrijding van de EFSA TDI van 0,5 mg/kg lg per dag zijn voor kinderen die dagelijks een grote hoeveelheid van de betrokken producten consumeren. Wanneer grote hoeveelheden van koekjes en chocolade genuttigd worden, wordt de TDI in het geval van de hoogste besmettingsniveaus, met een factor 3 overschreden (EFSA, 2008).

Het Amerikaanse voedsel- en geneesmiddelenagentschap (FDA)

De Amerikaanse Food and Drug Administration (FDA) schatte de blootstelling aan melamine via de consumptie van producten van dieren die gecontamineerd voeder aten. Omdat accumulatie van melamine in de weefsels weinig waarschijnlijk is, werd verondersteld dat de producten 100 µg/kg melamine en analogen bevatten (50 µg/kg melamine -i.e. LOD van aangewende analysemethode- werd verdubbeld om cyanuurzuur, dat niet geanalyseerd werd met die aangewende methode in rekening te brengen). De berekende blootstelling bleek meer dan twee orde van grootte kleiner te zijn dan de FDA TDI van 0,63 mg/kg lg per dag (FDA, 2007).

(In deze risico-evaluatie werd de mogelijkheid dat de melaminegecontamineerde gluten in de voedselketen terecht komen, bv. via vegetarische voedingsmiddelen rijk aan gluten, niet beschouwd.)

Het Canadese Gezondheidsagentschap (Health Canada)

Health Canada bepaalde een tijdelijke norm (maximumgehalte) specifiek voor zuigelingenvoeding en voedingsmiddelen die als enige bron van voeding fungeren, als een tussentijdse risicobeheersmaatregel op basis van een aantal theoretische blootstellingsscenario's (Health Canada, 2008a). Deze worden in Tabel 3 weergegeven.

Uit Tabel 3 blijkt dat een melamineconcentratie kleiner of gelijk aan 1 mg/kg in onmiddellijk te consumeren zuigelingenvoeding voor geen enkele leeftijdscategorie resulteert in een overschrijding van de door Health Canada aangenomen TRD van 0,35 mg/kg lg per dag. Aldus wordt door Health Canada 1,0 mg/kg voorgesteld als tijdelijke norm voor alle zuigelingenvoedingsproducten en aanverwante producten die als enige bron van voeding dienen, en dit in de vorm waarin deze producten verkocht worden. Deze tijdelijke norm geldt voor de concentratie van melamine én cyanuurzuur samen. De norm betreft eveneens geconcentreerde en poedervormige zuigelingenformuleringen zoals deze verkocht worden, waardoor bij consumptie van deze producten t.g.v. verdunning, een toegevoegde mate van bescherming geleverd wordt. Preliminair resultaten tonen aan dat eventuele achtergrondgehalten aan melamine in zuigelingenvoeding beneden de tussentijdse norm van

1 mg/kg gelegen zijn (Health Canada, 2008a). Evenwel, naar aanleiding van de in december 2008 door de WHO aanbevolen TDI van 0,2 mg/ kg lg per dag (WHO, 2008), verlaagde Health Canada deze tijdelijke norm van 1 naar 0,5 mg/kg (Health Canada, 2008b).

Tabel 3. Schatting van de melamine inname op basis van maximale consumptiedata voor zuigelingenvoeding en verschillende theoretische melamineconcentraties (1,0; 2,5; 20 mg/kg) (Health Canada, 2008a).

Leeftijdsklasse	lg ¹ (kg)	Max. consumptie zuigelingenvoeding ² (g/dag)	Melamine inname (mg/kg lg/dag) bij verschillende melamine concentraties (mg/kg)		
			1,0	2,5	20,0
prematuren	1,5	100	0,066	0,167	1,330
0-1 maand	3,9	1080	0,277	0,693	5,540
2-3 maanden	5,5	1470	0,267	0,668	5,340
4-7 maanden	7,2	1440	0,200	0,500	4,000
8-12 maanden	9,0	960	0,107	0,267	2,140
12-18 maanden	10,6	900	0,085	0,213	1,700

¹ Het gemiddelde gewicht van baby's en kleuters is gebaseerd op de groeistatistieken van "Pediatricians Guide to your Children's Health and Safety" (<http://www.keepkidshealthy.com/growthcharts/girlsbirth.html>)

² De consumptie van zuigelingenvoeding volgens de specifieke leeftijdsklassen zijn afkomstig uit "A Practical Guide to Baby Care" van het Institute National de Santé Publique du Québec (2001)

Health Canada voerde een gelijkaardige 'worstcase' blootstellingsschatting uit voor de totale bevolking (verschillende leeftijdscategorieën boven 1 jaar) via de consumptie van voedingsmiddelen die melk of melkgerelateerde ingrediënten bevatten. Hieruit bleek een actielimiet van 2,5 mg/kg voldoende om bij hoge consumptie (P90) de blootstelling onder de Health Canada TRD van 0,35 mg/kg lg per dag te houden, en dit ook voor de éénjarigen die de hoogste consumptie per kg lichaamsgewicht hebben (Health Canada, 2008a).

Het Franse Voedselagentschap (AFSSA)

Het AFSSA voerde eveneens een 'worstcase' risico-evaluatie uit waarbij twee doelgroepen beschouwd werden, nl. jonge kinderen (i.e. van 15 dagen tot 36 maanden oud) en de algemene bevolking (i.e. 3 jaar en ouder met onderscheid tussen de leeftijdsklassen 3-10j, 11-14j, 15-17j en 18j en ouder) (AFSSA, 2008a).

Tabel 4. Mogelijke inname van melamine via de voeding door kinderen jonger dan 3 jaar (AFSSA, 2008a).

Matrix	Scenario 1 ^a			Scenario 2 ^b		
	gemiddelde	%TDI ^c	P97,5	gemiddelde	%TDI	P97,5
Koekjes, cake, gebak	0,001 ± 0,003	0,3	0,011	0,002 ± 0,005	0,4	0,016
Zuiveldranken	0,007 ± 0,026	1,4	0,078	0,007 ± 0,026	1,4	0,078
Granen	0,000 ± 0,000	0,0	0,000	0,000 ± 0,000	0,0	0,000
Melk	0,018 ± 0,038	3,6	0,121	0,027 ± 0,056	5,4	0,178
Chips	0,000 ± 0,001	0,0	0,000	0,000 ± 0,003	0,0	0,000
Frisdrank, nectar, gearomatiseerd water	0,001 ± 0,005	0,2	0,008	0,001 ± 0,006	0,2	0,011
Snoepgoed	0,001 ± 0,005	0,2	0,016	0,014 ± 0,066	2,8	0,193
Eieren	0,001 ± 0,002	0,1	0,006	0,001 ± 0,002	0,2	0,008
TOTAAL	0,030 ± 0,046	6,0	0,145	0,052 ± 0,092	10,4	0,325

Alle melaminegehalten < LOQ worden gelijk gesteld aan de LOQ;

^a het melaminegehalte gebruikt in de berekening, is het gemiddelde melaminegehalte dat gedetecteerd werd voor het type matrix;

^b het melaminegehalte gebruikt in de berekening, is het maximale melaminegehalte dat gedetecteerd werd voor het type matrix.

^c m.b.t. gemiddelde inname, TDI = 0,5 mg/kg lg per dag (EFSA, 2008)

Er werden een aantal levensmiddelen categorieën beschouwd waarvan verondersteld werd dat de producten binnen deze categorieën gecontamineerd zijn met een bepaald

melaminegehalte (gemiddeld en maximaal gedetecteerd melaminegehalte in Frankrijk waarbij resultaten beneden de LOQ gelijk gesteld werden aan de LOQ). De resultaten m.b.t. jonge kinderen worden hernomen in Tabel 4. De EFSA TDI van 0,5 mg/kg lg per dag (EFSA, 2008) werd voor geen enkele doelgroep overschreden, zelfs niet in geval van het meest pessimistische scenario.

3.4. Risicokarakterisatie

Op basis van de beschikbare informatie lijkt het risico voor jonge kinderen (en volwassenen) verwaarloosbaar te zijn, zeker wanneer de voorgestelde actielimiet van 0,5 mg/kg toegepast wordt. Om evenwel het risico ten volle te kunnen karakteriseren, is het relevant om de oorsprong van de melamine (technische melamine, brandblusmiddelen, recyclage van oude materialen, residu uit de melamine industrie...?) waarmee de producten gecontamineerd werden, te kennen om alzo een idee te hebben over de onzuiverheden (met bijhorende toxiciteit) die zich in de gecontamineerde producten kunnen bevinden. Bovendien is er nog onvoldoende gekend over het synergetisch toxicologisch effect van melamine met cyanuurzuur (en andere analogen).

De melamine dosis waaraan de Chinese zuigelingen en jonge kinderen via de consumptie van verontreinigde melk werden blootgesteld, wordt door de WHO geschat op ongeveer 40-120 maal de TDI van 0,2 mg/kg lichaamsgewicht, wat de dramatische gevolgen van het incident verklaart. De conservatieve schatting van de WHO voor de potentiële blootstelling van volwassenen via met melamine verontreinigde voedingsmiddelen komt overeen met 0,8-3,5 maal de TDI (WHO, 2008). De geschatte blootstelling t.g.v. de aanwezigheid van sporen van melamine uit allerlei secundaire bronnen (7-15 µg/kg lichaamsgewicht per dag) is aanzienlijk lager dan de TDI.

4. Conclusie

Health Canada legde aan de hand van een risicobeoordeling een actielimiet van 0,5 mg/kg vast. Deze actielimiet lijkt op basis van de beperkte gegevens m.b.t. de achtergrondgehalten van melamine in (opvolg)zuigelingenvoeding, evenals op basis van de beschikbare analysemethodes haalbaar. Ofschoon een actielimiet voorgesteld kan worden, wenst het Wetenschappelijk Comité te benadrukken dat de concentraties aan mogelijke verontreinigingen in (opvolg)zuigelingenvoeding steeds zo laag mogelijk als redelijkerwijs haalbaar is, dienen te zijn temeer daar het een kwetsbare doelgroep betreft. Aan de consument wordt aangeraden zich te houden aan de erkende merken van (opvolg)zuigelingenvoeding, waarvan de samenstelling dient te voldoen aan wettelijke normen (KB van 18 februari 1991).

Het Wetenschappelijk Comité wenst bijkomend op te merken dat het probleem lange tijd kan aanslepen gezien het stokeerbare producten betreft (melkpoeder e.a.). Een vergelijking kan gemaakt worden met de zogenaamde "Tsjernobyl melk". Het is dan ook aan de industrie aan te raden om melamine en mogelijke fraude met niet-proteïne stikstof als potentieel gevaar te beshouwen in hun autocontrole, in het bijzonder bij de controle van grondstoffen afkomstig uit derde landen. Omdat melamine toegediend werd om de bepaling van de kwaliteit van de producten a.h.v. een stikstoffest te omzeilen, is het belangrijk dat meer specifieke, snelle en goedkope methoden ontwikkeld en toegepast worden voor de analyse van proteïnen, waarbij onderscheid gemaakt wordt met niet-proteïne stikstof.

Daarnaast kunnen onder meer volgende lacunes aangeduid worden:

- Er bestaat nog een grote onzekerheid m.b.t. de toxiciteit van de gecombineerde blootstelling van melamine, cyanuurzuur en de andere structurele analogen (species verschillen, mechanisme van de vorming en verdere karakterisatie van de niercalculi, specifieke gevoeligheid van kinderen, ...)
- De gegevens m.b.t. de blootstelling van melamine via andere bronnen dan frauduleuze toevoeging (contactmaterialen, pesticiden, ...) zijn beperkt

- Niet alleen het melaminegehalte, maar ook de gehalten aan cyanuurzuur, ammelide en ammeline in voedingsmiddelen, diervoeders en –ingrediënten dienen gerapporteerd te worden
- De carry-over ratio van melamine en analogen van diervoeders naar voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong (met inbegrip van vis) is tot op heden niet gekend;

Voor het Wetenschappelijk Comité,
De Voorzitter,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert

Brussel, 13 maart 2009

Referenties

AFSSA (2008a) The opinion of the French Food Safety Agency concerning the risk assessment of melamine exposure from the consumption of contaminated foodstuffs from China. <http://www.afssa.fr/Documents/AAAT2008sa0301EN.pdf>

AFSSA (2008b) Opinion of the French Food Safety Agency (Afssa) on the possible transfer of melamine to foodstuffs from broiler chickens and laying hens. 4 November 2008. <http://www.afssa.fr/Documents/ALAN2008sa0333EN.pdf>

Baynes R., Smith G., Mason S., Barrett E., Barlow B. & Riviere J. (2008) Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1196-1200.

Bradley E., Boughtflower V., Smith T., Speck D. & Castle L. (2005) Survey of the migration of melamine and formaldehyde from melamine food contact articles available on the UK market. *Food Addit. Contam.* 22, 597-606.

Dobson R., Motlagh S., Quijano M., Cambron R., Baker T., Pullen A., Regg B., Bigalow-Kern A., Vennard T., Fix A., Reimschuessel R., Overmann G., Shan Y. & Daston G. (2008) Identification and characterisation of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicol. Sci.* 106, 251-262.

ECB (2000) IUCLID (International Uniform Chemical Database) Dataset: Melamine. European Commission- Institute for Health and Consumer Protection (IHCP) - European Chemicals Bureau (ECB, now: Consumer Products Safety & Quality (CPS&Q) Unit). <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/IUCLID-DataSheets/108781.pdf>

EFSA (2008) Statement of EFSA on risks for public health due to the presences of melamine in infant milk and other milk products in China (Question number: EFSA-Q-2008-695) http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902098495.htm

EFSA (2007) EFSA provisional statement on a request from the European Commission related to melamine and structurally related to compounds such as cyanuric acid in protein-rich ingredients used for food and feed (Question number: EFSA-Q-2007-093). http://www.efsa.eu.int/cs/BlobServer/Statement/efsa_statement_melamine_en_rev1.pdf?ssbinary=true

EMA (2001) Committee for veterinary medicinal products: Cyromazine – summary report (2) <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/077000en.pdf>

EPA (1999) Cyromazine; Pesticide Tolerance. Volume 64 (178). <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1999/September/Day-15/p24047.htm>

FDA (2008a) Interim safety and risk assessment of melamine and its analogues in food for humans, October 3, 2008. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/melamra3.html>

FDA (2007) Interim Melamine and Analogues Safety/Risk Assessment [<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/melamra.html>]

Gold L., Slone T. & Bernstein L. (1989) Summary of carcinogenic potency and positivity for 492 rodent carcinogens in the carcinogenic potency database. *Environ. Health Perspect.* 79, 259-272.

Health Canada (2008a) Health Canada's human health risk assessment supporting standard development for melamine in foods. November, 2008. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/melamine_hra-ers-eng.pdf

Health Canada (2008b) Health Canada has re-assessed its maximum tolerable limit for melamine in infant formula. December 4, 2008. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/melamine_errata-eng.pdf

IARC (1999) IARC Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans. Vol. 73: Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/volume73.pdf>

Kirk-Othmer (2004) Encyclopedia of Chemical Technology, 5th edition, Vol.8, Cyanamides. John Wiley & Sons, pp. 157-171.

Lahalih S. & Absi-Halabi M. (1989) Recovery of solids from melamine waste effluents and their conversion to useful products. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 28, 500–504.

Langman C. (2009) Melamine, powdered milk, and nephrolithiasis in Chinese infants. *The New England Journal of Medicine* (article 10.1056/NEJMe0900361 published at NEJM.org on February 4, 2009)

Lund K.H. & Petersen J.H. (2006) Migration of formaldehyde and melamine monomers from kitchen- and tableware made of melamine plastic. *Food Addit. Contam.* 23, 948-955.

Na G., Qingfeng F., Jie D., Yiming Z., Jingqiao L., Yi A., Guobin X., Sainan ZS., Chen Y., Lina J., Jing M., Han Z., Dan Z., Xiaoyu L. & Y. (2009) Melamine-contaminated Powdered formula and urolithiasis in young children. *The New England Journal of Medicine* (article 10.1056/NEJoa0809550 published at NEJM.org on February 4, 2009)

NTP (1983) Carcinogenesis Bioassay of Melamine (CAS No 108-78-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Study), National Toxicology Program, Technical Report Series No 245, March.

OECD (1998) Screening Information Data Set for Melamine, CAS No. #108-78-1. <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/108781.pdf>

Puschner B., Poppenga R., Lowenstine L., Filigenzi M. & Pesavento P. (2007) Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 616-624.

Reimschuessel R., Giesecker C., Miller R., Ward J., Boehmer J., Rummel N., Heller D., Nochetto C., de Alwis G., Bataller N., Andersen W., Turnipseed S., Karbiwnyk C., Satzger R., Crowe J., Wilber N., Reinhard M., Roberts J. & Witkowski M. (2008) Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fish and pigs. *Am. J. Vet. Res.* 69(9), 1217-1228.

WHO (2008) Expert meeting to review toxicological aspects of melamine and cyanuric acid. Ottawa Canada, 1-4 December 2008. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_events/en/index.html

Wittcoff H., Reuben B. & Plotkin J. (2004) Industrial organic chemicals. 2nd edition. Chapter 10. Chemicals from methane. 10.5.1.1 Urea and melamine resins. Wiley, pp. 360-362.

Leden van het Wetenschappelijk Comité

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden:

D. Berkvens, C. Bragard, E. Daeseleire, P. Delahaut, K. Dewettinck, J. Dewulf, L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, P. Lheureux, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, C. Saegerman, B. Schiffers, E. Thiry, T. van den Berg, M. Uyttendaele, C. Van Peteghem, G. Vansant

Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt het wetenschappelijk secretariaat en de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerp advies. De werkgroep was samengesteld uit:

Leden Wetenschappelijk Comité	A. Huyghebaert (verslaggever), G. Maghuin-Rogister, C. Van Peteghem
Externe experts	J.-P. Buts (ULC), P. Daenens (K.U.Leuven), C. Vleminckx (WIV)

Wettelijk kader van het advies

Wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8;

Koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen;

Huishoudelijk reglement, bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 27 maart 2006.

Disclaimer

Het Wetenschappelijk Comité behoudt zich, te allen tijde, het recht voor dit advies te wijzigen indien nieuwe informatie en gegevens ter beschikking komen na de publicatie van deze versie.

Bijlage: Summarized overview of the available toxicological data of melamine

Melamine is an important chemical commodity used for the production of melamine–formaldehyde resins. The toxicity of melamine has been extensively investigated and reported in the literature. Reviews had been released by ECETOC (1983) and IARC (1986 & 1999). In rats and humans, melamine is a metabolite of the anti-neoplastic agent hexamethylmelamine (Worzalla et al., 1974). The carcinogenic potency of melamine had been investigated in the National Toxicology Program (1983). The results are discussed below.

1.1 Absorption, distribution, excretion and metabolism

After administration of melamine as a single oral dose at 250 mg/kg bw in rats or dogs, 50% and 61.3%, respectively, of unmodified melamine was excreted in the urine in 6 h (Lipschitz & Stokey, 1945). Nearly 20% of the melamine excreted by the rats was recovered as the crystalline dimelamine-monophosphate.

In adult male Fischer 344/N rats given [¹⁴C]melamine as a single oral dose at 0.38 mg, melamine was rapidly excreted (90% of the administered dose within 24 h in the urine). Negligible radioactivity was detected in exhaled air and faeces. Melamine was distributed in the body water. Kidney and bladder showed higher concentrations of radioactivity than did plasma. Virtually no residual radioactivity was observed in the tissues at 24 h after dosing or later. The plasma half-life was 2.7 h, which is in good agreement with the urinary excretion half-life of 3.0 h. Radioactivity in plasma and urine co-chromatographed with unchanged melamine, indicating that melamine is not metabolized in the rat (Mast et al., 1983).

1.2 Toxicological studies

(a) Acute toxicity

Melamine has very low acute toxicity. The oral LD₅₀ values for melamine given in corn oil by gavage were reported to be 3161 and 3828 mg/kg bw in male and female Fischer 344/N rats, and 3296 and 7014 mg/kg bw for male and female B6C3F₁ mice (National Toxicology Program, 1983). White crystals were found in the stomach of three out of five male and four out of five female rats at 10 000 mg/kg bw, four out of five males and five out of five females at 6810 mg/kg bw, one out of five males and two out of five females at 3160 mg/kg bw and one out of five males at 2150 mg/kg bw. In mice, no compound-related toxic effects were observed at necropsy. In another study in mice, the oral LD₅₀ was 4500 mg/kg bw. Reported signs of toxicity were lachrimation, dyspnoea, intermittent tremors and coma preceding death. Vasodilatation in the tail and ears and paralysis of the forequarters were also observed (ECETOC, 1983). Melamine applied as a paste to the skin of rabbits at 1000 mg/kg bw did not induce toxicity or local irritation (ECETOC, 1983). Introduction of melamine powder into the rabbit eye caused mild transient irritation (ECETOC, 1983). There was no sensitization in guinea-pigs (ECETOC, 1983).

(b) Short-term studies of toxicity

Mice

Groups of five male and five female B6C3F₁ mice were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 5000, 10 000, 15 000, 20 000, or 30 000 ppm for 14 days. All animals survived to the end of the study. Treatment seemed to have no effect on body weight. A hard crystalline solid was found in the urinary bladder of all male mice and in two out of five female mice at 30 000 ppm. No other compound-related effects were observed at necropsy (National Toxicology Program, 1983).

Groups of 10 male and 10 female B6C3F₁ mice were fed diets containing melamine at a concentration of 0, 6000, 9000, 12 000, 15 000, or 18 000 ppm (equivalent to 0, 900, 1350, 1800, 2250 and 2700 mg/kg bw per day) for 13 weeks. One female at 9000 ppm died. Body-weight gain was depressed in all treated groups. The incidence of mice with bladder calculi was dose-related and was greater in males than in females. Bladder calculi were found

at dietary concentrations of 12 000 ppm and greater (6 out of 10, 9 out of 10 and 7 out of 10 in males, and 1 out of 10, 3 out of 10 and 7 out of 10 in females, at 12 000, 15 000 and 18 000 ppm, respectively). Ulceration of the urinary bladder epithelium was also dose-related and was observed at dietary concentrations of 9000 ppm and greater. Bladder ulcers were multifocal or associated with inflammation (cystitis). The results were considered not to provide evidence for an association between ulceration and bladder calculi in either sex. Since the body weight effects at 6000 ppm (equivalent to 900 mg/kg bw per day) were of questionable biological significance, this dose could be considered as a NOAEL (National Toxicology Program, 1983).

Rats

In rats treated with melamine, no histological effects were seen, except for crystalline deposits in the renal tubules found after five successive intraperitoneal doses at 500 mg/kg bw per day. No symptoms were observed except for moderate transient weight loss (ECETOC, 1983).

Groups of five male and five female Fischer 344/N rats were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 5000, 10 000, 15 000, 20 000, or 30 000 ppm for 14 days. Body-weight gain was reduced at dietary concentrations of 15 000 ppm and greater. A hard crystalline solid was found in the urinary bladder of most males at $\geq 10\ 000$ ppm and in four out of five females at $\geq 20\ 000$ ppm. The kidneys of two out of five males at 30 000 ppm were pale and pitted. The details given of the study were limited, but the highest NOAEL appeared to be 5000 ppm (National Toxicology Program, 1983).

Three 13-week studies were performed in rats.

In the first study, groups of 12 male and 12 female F344/N rats were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 0, 6000, 9000, 12 000, 15 000, or 18 000 ppm, equivalent to 0, 600, 900, 1200, 1500 and 1800 mg/kg bw per day. One male at 18 000 ppm and two males at 6000 ppm died. Body-weight gain at a dietary concentration of 12 000 ppm and greater was depressed and food consumption was reduced at 18 000 ppm. Calculi were found to occur in the urinary bladder of most male rats in a dose-related manner and in the bladder of some females at $\geq 15\ 000$ ppm. Histopathological evaluation was performed on 10 animals of each sex from the control group and groups at, 6000 and 18 000 ppm. Diffuse epithelial hyperplasia of the urinary bladder was found in 8 out of 10 males and 2 out of 10 females at 18 000 ppm, while in rats at 6000 ppm, focal epithelial hyperplasia was only found in 1 out of 10 males and in none of the females. No other compound-related histopathological effects were observed (National Toxicology Program, 1983).

In the second 13-week study, groups of male and female F344/N rats were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 0, 750, 1500, 3000, 6000, or 12 000 ppm, equivalent to 0, 75, 150, 300, 600 and 1200 mg/kg bw per day. Body-weight gain was depressed in males only at 6000 and 12 000 ppm. Urinary bladder calculi were not observed in treated or control females, but the incidence among male rats increased in a dose-related manner (1 out of 10, 2 out of 10, 5 out of 10, 7 out of 10, 9 out of 10 and 9 out of 9 in the controls and at 750, 1500, 3000, 6000 and 12 000 ppm, respectively). Hyperplasia of the transitional epithelium of the bladder was observed to occur in a dose-dependent manner for male rats at ≥ 3000 ppm (1 out of 10, 3 out of 10 and 9 out of 9 in the groups at 3000, 6000 and 12 000 ppm, respectively). There was no evidence of hyperplasia of the bladder epithelium in female rats. Dose-related calcareous deposits were observed in the straight segments of the proximal tubules in females. Microscopic evaluation of the urine did not provide evidence of melamine crystalluria. The NOAEL for hyperplasia was 1500 ppm, equivalent to 150 mg/kg bw per day and the NOAEL for urinary bladder calculi was 750 ppm, equivalent to 75 mg/kg bw per day (National Toxicology Program, 1983).

In the third 13-week study, F344/N rats were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 0, 10 000 or 18 000 ppm in the presence and absence of 1% ammonium chloride in the drinking-water to see if this treatment might affect the incidence of calculus formation in the urinary tract. Ammonium chloride had no effect on calculus formation (National Toxicology Program, 1983).

Rabbits and dogs

In rabbits and dogs fed with melamine at a dose of 126 mg /kg bw per day for 1 to 4 weeks, no effects were found, either macro- or microscopically (ECETOC, 1983).

(c) *Long-term studies of toxicity and carcinogenicity*

Mice

Groups of 50 male and 50 female B6C3F₁ mice were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 0, 2250 or 4500 ppm (equivalent to 0, 338 or 675 mg/kg bw per day) for 103 weeks, followed by a basal diet for 2 weeks before sacrifice. All animals were observed twice daily for morbidity or mortality. Clinical signs were recorded monthly. Body weight and feed consumption by cage (five animals per cage) were recorded once per week for the first 13 weeks, monthly until week 91 and then every 2 weeks. Necropsies were performed on all animals found dead and those killed at the end of the study. Animals were examined for gross and histopathological abnormalities.

Mean body weights of male mice at the highest dose were slightly lower than those of controls after week 50 of the study (decrease in body-weight gain, 21%). Survival at termination of the study was: 39 out of 49 (80%), 36 out of 50 (72%) and 28 out of 50 (56%) in males in the control group and at the lower and higher dose, respectively and 37 out of 50 (74%), 43 out of 50 (86%) and 41 out of 50 (82%) in females in the control group and at the lower and higher dose, respectively. The reduction in the survival of males at the highest dose was statistically significant ($p = 0.013$). No treatment-related increase in the incidence of tumours was observed. In male mice, treatment-related increases were observed in the incidence of urinary bladder calculi (2 out of 45, 40 out of 47 and 41 out of 44 in the control group and at the lower and higher dose, respectively), in the incidence of acute and chronic inflammation of the urinary bladder (0 out of 45, 25 out of 47 and 24 out of 44 in mice in the control group and at the lower and higher dose, respectively) and in the incidence of epithelial hyperplasia of the bladder (1 out of 45, 11 out of 47 and 13 out of 44 in mice in the control group and at the lower and higher dose, respectively). Urinary bladder calculi, acute and chronic inflammation of the urinary bladder and epithelial hyperplasia were seen in 4 out of 50 females at the highest dose. No NOAEL could be established for males, the LOAEL was 2250 ppm, equivalent to 338 mg/kg bw per day and the NOAEL for females was 2250 ppm, equivalent to 338 mg/kg bw per day (National Toxicology Program, 1983).

Rats

Groups of 50 male and 50 female Fischer 344/N rats were fed diets containing melamine at a concentration of 0, 2250 or 4500 ppm (males) or 0, 4500 or 9000 ppm (females) for 103 weeks, followed by a basal diet for 2 weeks before sacrifice. Doses were equivalent to 0, 113 or 225 in males and 0, 225 or 450 mg/kg bw per day in females. All animals were observed twice daily for morbidity or mortality. Clinical signs were recorded monthly. Body weight and feed consumption by cage (five animals per cage) were recorded once per week for the first 13 weeks, monthly until week 91 and then every 2 weeks. Necropsies were performed on all animals found dead and those killed at the end of the study. Animals were examined for gross and histopathological abnormalities.

Survival was significantly reduced in males at the highest dose ($p = 0.03$) from week 101. Survival rates at termination of the study were: 30 out of 49 (61%), 30 out of 50 (60%) and 19 out of 50 (38%) in males in the control group and at the lowest and highest dose, respectively and 34 out of 50 (68%), 30 out of 50 (60%) and 27 out of 50 (54%) in females in the control group and at the lower and higher dose, respectively. The incidence of transitional-cell carcinomas of the urinary bladder in males was 0 out of 45, 0 out of 50 and 8 out of 49 (trend $p \leq 0.002$) in the control group and the lower and higher dose, respectively. The incidence in the group at the highest dose was significantly higher ($p \leq 0.016$) than in the controls. There was also a dose-related incidence of bladder calculi in males (0 out of 45, 1 out of 50, and 10 out of 49 in the control group and at the lower and higher dose, respectively). In a separate study, X-ray microscopic analysis of two urinary bladder calculi obtained from male F344/N rats fed diets containing melamine at 16 000 or 19 000 ppm indicated that the principal component of the calculi was melamine. Of 49 males at the highest dose, seven had transitional-cell carcinomas and bladder calculi, one had a carcinoma without calculi and three had calculi without carcinoma (one of these rats had a papilloma and one had epithelial hyperplasia). There was therefore a statistically significant ($p < 0.001$) correlation between the presence of bladder calculi and bladder tumours. Females had no bladder calculi and one female in each of the groups at the lowest and highest dose

had a papilloma of the bladder. A statistically significant increase ($p \leq 0.01$) in the incidence of chronic inflammation of the kidney was observed in females (4 out of 49, 17 out of 49 and 41 out of 47 in the control group and at the lower and higher dose, respectively). The dose–response relationship and intensity of the increased interstitial lymphoplasmocytic infiltrates and cortical fibrosis clearly set these changes apart from the minor inflammatory component that may accompany the progressive nephropathy normally encountered in ageing F344/N rats. Chronic inflammation of the kidney was not significant in male rats receiving melamine. The NOAEL for males was 2250 ppm, equivalent to 113 mg/kg bw per day and for females no NOAEL could be established, the LOAEL was 4500 ppm, equivalent to 225 mg/kg bw per day (National Toxicology Program, 1983).

Groups of 20 male F344 rats were fed diets containing melamine (purity, > 99%) at a concentration of 0.3%, 1% or 3% (equivalent to 150, 500 and 1500 mg/kg bw per day) for a total of 36 weeks followed by a 4-week recovery period. Ten animals per group underwent exploratory laparotomy at the end of week 36 and all animals were killed at week 40. Bladder weight in rats receiving 3% melamine in the diet was threefold that in controls. The incidences of papillary or nodular hyperplasia were 0%, 5%, 30% and 63% in the control group and at the lowest, intermediate and highest dose, respectively; incidences of papillomatosis were 0%, 0%, 25% and 89% and those of calculi were 0%, 0%, 70% and 100% at 36 weeks and 0%, 20%, 45% and 42% at 40 weeks. Carcinomas of the urinary bladder were observed in 0 out of 20, 1 out of 20 and 15 out of 19 rats at the lowest, intermediate and highest doses and papillomas in 0 out of 20, 1 out of 20 and 12 out of 19 rats, respectively. One carcinoma and three papillomas of the ureter were also induced in 19 rats at the highest dose. The correlation between calculus formation at week 36 and tumour incidence at week 40 was highly significant ($p = 0.0065$) (Okumura et al., 1992; IARC, 1999).

Groups of 20 male F344/DuCrj rats were fed diets containing melamine (purity, 99.94%) at a concentration of 1% or 3% with or without 5% or 10% aqueous sodium chloride solution (NaCl) for a total of 36 weeks and were killed at week 40. Water intake, as a surrogate for urinary output, was increased in groups exposed to 3% melamine, with or without 5% or 10% NaCl, in groups exposed to 1% melamine with 5% or 10% NaCl and in a group exposed to 10% NaCl only; water intake was not increased in animals exposed to 1% melamine only. The incidences of calculi and papillomatosis were 30% and 75% with 3% melamine, 75% and 85% with 3% melamine plus 5% NaCl, 30% and 10% with 3% melamine plus 10% NaCl, 37% and 47% with 1% melamine, 11% and 11% with 1% melamine plus 5% NaCl, 5% and 0% with 1% melamine plus 10% NaCl. No calculi or papillomatosis were reported in controls or with 10% NaCl alone.

Urinary bladder carcinomas were observed in 4 out of 19, 18 out of 20 and 18 out of 20 rats given 1% melamine alone, 3% melamine alone or 3% melamine plus 5% NaCl, respectively. No carcinomas were observed in the groups receiving 3% melamine plus 10% NaCl or 1% melamine plus 5% or 10% NaCl. The incidences of papillomas were similarly decreased by NaCl. In contrast to the incidence of 10 out of 20 in the group given 3% melamine alone, 5 out of 20 and 3 out of 20 rats receiving 3% melamine plus 5% NaCl or 10% NaCl respectively, developed papillomas. Papillomas developed in 8 out of 19 rats receiving 1% melamine alone.

Therefore, the addition of NaCl to 1% melamine decreased the incidences of calculi and papillomatosis, in parallel with a decrease in the incidence of neoplasia. With 3% melamine, NaCl did not affect the induction of calculi or papillomatosis but decreased the incidence of neoplasia. Thus, with the lower concentration of melamine, NaCl appeared to increase urinary output and decrease the incidences of hyperplasia, calculus formation and neoplasia. Chemical analysis of the calculi showed that they contained approximately equal amounts of melamine and uric acid on a molar basis, which together accounted for 61–81% of the weight (Ogasawara et al., 1995; IARC, 1999).

On the basis of these studies, it has been concluded that bladder tumours are associated with administration of high doses of melamine, and that the tumours are related to precipitation of urinary melamine with the formation of melamine/uric acid containing urinary-tract calculi, producing urothelial toxicity and consequent regeneration of the bladder epithelium and ultimately the formation of tumours (IARC, 1999; Meek et al., 2003). Although the correlation between calculi, ulceration, hyperplasia and formation of bladder tumours has not been 100%, explanations on the basis of studies with other

chemicals such as uracil have been advanced to explain the discrepancies (Clayson et al., 1995, Fukushima et al., 1992). Ulcerations secondary to calculi formation occur relatively rapidly and are repaired, even with continued presence of the calculus. It is thus not unusual to see extensive proliferation of the bladder epithelium in the presence of calculi at later time-points, such as those seen in the experiments with melamine, without an associated ulceration or intense inflammatory response. Chronic inflammation is frequently present, however. Similarly, correlation between the presence of calculi and tumours at later time-points is not 100%. This has been explained by the loss of calculi during the experiment, either by dissolution or, more likely, spontaneous evacuation from the urinary tract (Clayson et al., 1995; IARC, 1999b).

There is significantly less risk in humans for developing bladder cancer from calculi than in rodents, most likely owing primarily to the usually short time that calculi are present in humans due to anatomic and obstructive issues (IARC, 1999b).

(d) *Genotoxicity*

The genotoxic potential of melamine was assessed in several tests in vitro and in vivo (Table 35). With the exception of prophage induction, all the tests gave negative results. The Meeting considered that melamine is not genotoxic.

Table 1. Results of studies of genotoxicity with melamine, a metabolite of cyromazine

End-point	Test object	Concentration	Results	Reference
Prophage induction	<i>E. coli</i> WP2s (λ)	78 μ g/well	Positive ^a	Rossmann et al. (1991)
Reverse mutation	<i>S. typhimurium</i> his G46, TA1530, TA1531, TA1532 and TA1534		Negative ^c	Seiler (1973)
	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98 and TA100	\leq 500 μ g/plate	Negative ^a	Jagannath & Brusick (1977)
	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>		Negative	Lusby et al. (1979)
	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1538, TA98 and TA100		Negative ^a	Mast et al. (1982a)
Gene conversion	<i>S. cerevisiae</i> D4		Negative ^a	Jagannath & Brusick (1977)
	Chinese hamster ovary (CHO), <i>Hprt</i> locus	0.6–1 mg/ml	Negative ^a	Mast et al. (1982a) National Toxicology Program (1983)
Gene mutation	Mouse lymphoma L5178Y, <i>Tk</i> locus	\leq 160 μ g/ml	Negative ^a	McGregor et al. (1988)
Chromosomal aberration	CHO		Negative	National Toxicology Program (1983)
Sister chromatid exchange	CHO	\leq 1 mg/ml	Negative ^a	Mast et al. (1982a)
Unscheduled DNA synthesis	Primary rat hepatocytes	\leq 6 mg/ml	Negative	Mirsalis et al. (1983); National Toxicology Program (1983); ECETOC (1983)
Sex-linked	<i>Drosophila melanogaster</i>	1% feed	Negative	Röhrborn (1962)

recessive lethal mutations				
Micronucleus test (BM cells)	Mice	Single oral dose at 1000 mg/kg bw or 2 × 1000 mg/kg bw (24 h apart)	Negative	Mast et al. (1982b) National Toxicology Program (1983)

S9, 9000 × *g* supernatant from livers of Aroclor-induced rats or hamsters.

^a With and without metabolic activation.

^b S9 from the liver of Aroclor-induced rats or hamsters, liquid pre-incubation assay.

^c Without S9.

(e) *Reproductive toxicity*

No toxic effect or gross malformation was found in fetuses of pregnant rats injected intraperitoneally with melamine at a dose of 70 mg/kg bw on days 5 and 6, 8 and 9 or 12 and 13 of gestation (Thiersch, 1957). This study was considered to be inadequate for an evaluation of prenatal toxicity owing to incomplete reporting of experimental methods and results of fetal examinations (IARC, 1999).

(f) *Special studies*

A study of skin initiation/promotion to investigate the initiation activity of melamine was performed in CD-1 mice. At a single topical dose of 1 µmol (approx. 6 mg/kg bw) melamine (unknown purity) in 0.2 ml acetone followed by twice-weekly applications of 10 nmol of 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) in 0.2 ml acetone for 31 weeks, there was no increase in the incidence of papillomas in comparison to controls (acetone + TPA) (19% compared with 14% in controls) (Perrella & Boutwell, 1983; IARC, 1986).

Summary: Melamine has been investigated for its toxicological properties and results were reported in the published literature. The main toxic effects of dietary melamine exposure in rats and mice were calculi formation (constituted by melamine and uric acid), inflammatory reactions and hyperplasia in the urinary bladder. The NOAEL for urinary bladder hyperplasia was 1500 ppm (equivalent to 150 mg/kg bw per day) and for urinary bladder calculi was 750 ppm (equivalent to 75 mg/kg bw per day) in a 90-day rat study. Induction of carcinomas of the urinary bladder occurred in male rats fed diets containing 4500 ppm (equivalent to 225 mg/kg bw per day) melamine for 103 weeks, but not in female rats or in male or female mice. Papillomas of the bladder were observed in one female in each of the treated groups (4500 and 9000 ppm) as well as a dose-related increase in the incidence of chronic inflammation of the kidney. The NOAEL for males was 2250 ppm, equivalent to 113 mg/kg bw per day and for females no NOAEL could be established, the LOAEL was 4500 ppm, equivalent to 225 mg/kg bw per day. Melamine is not genotoxic neither *in vitro* nor *in vivo*. Although bladder tumours related to calculi formation are not considered to be species-specific, they are related to administration of high doses¹. Bladder tumours were related to precipitation of urinary melamine with the formation of melamine/uric acid containing urinary tract calculi, producing urothelial toxicity and consequent regeneration of the bladder epithelium and ultimately formation of tumours. The non-DNA-reactive mechanism by which melamine produced urinary bladder tumours in male rats occurred only under conditions in which calculi were produced. There is significantly less risk in humans for developing bladder cancer from calculi than in rodents, most likely due to the usually short time calculi are present in humans due to anatomic and obstructive issues¹. These bladder tumours are thus a high dose effect having a threshold well above the expected human exposure through residues.

¹ IARC Concensus report (1999b) In: Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis. Capen C.C., Dybing E., Rice J.M. and Wilbourn J.D., eds., pp 1-14, IARC Scientific Publications No. 147, Lyon, France.

References

- Clayson D.B., Fishbein L., Cohen S.M. (1995) Effects of stones and other physical factors on the induction of rodent bladder cancer. *Fd Chem Toxic* 33, 771-784.
- ECETOC (1983) Joint Assessment of Commodity Chemicals N°1, MELAMINE, CAS: 108-78-1, European Chemical Industry and Ecology & Toxicology Centre, D-1983-3001/12.
- Fukushima S., Tanaka H., Asakawa E., Kagawa M., Yamamoto A. and Shirai T. (1992) Carcinogenicity of uracil, a non-genotoxic chemical, in rats and mice and its rationale. *Cancer Res.* 52, 1675-1680.
- Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W. and Zeiger E. (1983) Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutagenesis*, suppl. 1, 3-142.
- IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (1986), Some Chemicals used in Plastics and Elastomers, vol. 39, 333-346.
- IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (1999a) Some Chemicals that cause Tumours of the Kidney or Urinary Bladder in Rodents and some other Substances, vol. 73, 329-338.
- IARC Concensus report (1999b) Capen C.C., Dybing E., Rice J.M. and Wilbourn J.D., eds. In: Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis., IARC Scientific Publications No. 147, Lyon, France, pp 1-14.
- Jagannath D.R. and Brusick D.J. (1977) Mutagenicity evaluation of melamine. Report of Litton Bionetics.
- Lipschitz W. L. and Stokey E. (1945) The mode of action of three new diuretics: melamine, adenine and formoguanamine. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 83, 235-249.
- Lusby A., Simmons Z., McGuire P. (1979) Variation in mutagenicity of s-triazine compounds tested on four Salmonella strains. *Env. Mutagenesis* 1, 287-290.
- Mast R. W., Friedman M.A. and Finch R.A. (1982a) Mutagenicity testing of melamine (Abstract). *Toxicologist* 2, 172.
- Mast R.W., Naismith R.W. and Friedman M.A. (1982b) Mouse micronucleus assay of melamine (Abstract). *Envir. Mutagen.* 4, 340-341.
- Mast, R.W., Jeffcoat A.R., Sadler B.M., Kraska R.C. and Friedman M.A. (1983), Metabolism, disposition and excretion of [¹⁴C]melamine in male Fischer 344 rats, *Fd. Chem. Toxic.*, 21, 807-810.
- McGregor D.B., Brown A., Cattanach P., Edwards I., McBride D., Riach C. and Caspary W.J. (1988) Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutag.*, 12, 85-154.
- Meek M.E., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKeeman L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J. and Patton D.E. (2003) A Framework for Human Relevance Analysis of information on Carcinogenic Modes of action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33 (6), 591-653.
- Mirsalis J., Tyson K., Beck J., Loh F., Steinmetz K., Contreras C., Austere L., Martin S. and Spalding J. (1983) Induction of unscheduled DNA synthesis (UDS) in hepatocytes following in vitro and in vivo treatment (Abstract No. Ef-5). *Environ. Mutagenesis*, 5, 482.
- NTP (1983) Carcinogenesis Bioassay of Melamine (CAS No 108-78-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Study), National Toxicology Program, Technical Report Series No 245, March.
- Ogasawara H, Imaida K, Ishiwata H, Toyoda K, Kawanishi T, Uneyama C, Hayashi S, Takahashi M, Hayashi Y. (1995) Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation. *Carcinogenesis* 16 (11), 2773-2777.
- Okumura M, Hasegawa R, Shirai T, Ito M, Yamada S, Fukushima S. (1992) Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents thymine or melamine. *Carcinogenesis* 13 (6), 1043-1045.
- Perrella F.W. and Boutwell R.K. (1983) Triethylenemelamine: an initiator of two-stage carcinogenesis in mouse skin which lacks the potential of a complete carcinogen. *Cancer Lett.*, 21, 37-41.
- Röhrborn G. (1962) Chemische Konstitution und mutagene Wirkung II Triazinderivate. *Zeitschrift für Vererbungslehre* 93, 1-6.
- Rossmann T.G., Molina M., Meyer L., Boone P., Klein C.B., Wang Z., Li F., Lin W.C. and Kinney P.L. (1991) Performance of 133 compounds in the lambda prophage induction end-point of the Microscreen assay and a comparison with s. typhimurium mutagenicity and rodent carcinogenicity assay. *Mutat. Res.* 260, 349-367.

Seiler J. (1973) A survey on the mutagenicity of various pesticides. *Experientia* 29, 622-623.
Thiersch J.B. (1957) Effect of melamine, triethylenemelamine and triethylenephosphoramidate on rat litter in utero. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94, 36.
Worzalla J., Kaiman B.D., Johnson B.M., Ramirez G. and Bryan G.T. (1974) Metabolism of hexamethylmelamine-ring-¹⁴C in rats and man. *Cancer Res.* 34, 2669-2674.