



Pêches et Océans
Canada

Fisheries and Oceans
Canada

Sciences des écosystèmes
et des océans

Ecosystems and
Oceans Science

Secrétariat canadien des avis scientifiques (SCAS)

Document de recherche 2022/070

Région de la capitale nationale

Évaluation des risques indirects pour la santé humaine posés par les poissons combattants GloFish^{MD} Moonrise Pink^{MD} (PiBS2019), GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD} (OBS2019) et GloFish^{MD} Electric Green^{MD} (GBS2019) utilisés comme poissons d'ornement d'aquarium au Canada

Kassim Ali et Stephen Dugan

Bureau de l'évaluation et du contrôle des substances nouvelles
Direction de la sécurité des milieux
Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs
Santé Canada
269, avenue Laurier, Ottawa (Ontario) K1A 0K9

Avant-propos

La présente série documente les fondements scientifiques des évaluations des ressources et des écosystèmes aquatiques du Canada. Elle traite des problèmes courants selon les échéanciers dictés. Les documents qu'elle contient ne doivent pas être considérés comme des énoncés définitifs sur les sujets traités, mais plutôt comme des rapports d'étape sur les études en cours.

Publié par :

Pêches et Océans Canada
Secrétariat canadien des avis scientifiques
200, rue Kent
Ottawa (Ontario) K1A 0E6
Canada

[http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/
csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca](http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca)



© Sa Majesté le Roi du chef du Canada, représenté par le ministre du
ministère des Pêches et des Océans, 2022

ISSN 2292-4272

ISBN 978-0-660-45886-1 N° cat. Fs70-5/2022-070F-PDF

La présente publication doit être citée ainsi :

Ali, K. et Dugan S. 2022. Évaluation des risques indirects pour la santé humaine posés par les poissons combattants GloFish^{MD} Moonrise Pink^{MD} (PiBS2019), GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD} (OBS2019) et GloFish^{MD} Electric Green^{MD} (GBS2019) utilisés comme poissons d'ornement d'aquarium au Canada. Secr. can. des avis sci. du MPO. Doc. de rech. 2022/070. iv + 24 p.

Also available in English:

Ali, K. and Dugan S. 2022. *Indirect Human Health Risk Assessment of the GloFish® Moonrise Pink® Betta (PiBS2019), GloFish® Sunburst Orange® Betta (OBS2019) and the GloFish® Electric Green® Betta (GBS2019) for use as ornamental aquarium fish in Canada.* DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2022/070. iv + 21 p.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| RÉSUMÉ..... | iv |
| INTRODUCTION | 1 |
| ÉVALUATION DES DANGERS | 1 |
| IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES <i>BETTA SPLENDENS</i> PiBS2019, OBS2019, ET GBS2019..... | 1 |
| Nom binomial | 1 |
| Taxonomie | 1 |
| Synonymes, noms communs et périmés | 2 |
| Caractérisation et justification de l'identification taxonomique | 2 |
| Historique des souches | 2 |
| Modifications génétiques : but, méthode, modifications génétiques et phénotypiques..... | 3 |
| Propriétés biologiques et écologiques | 3 |
| EFFETS SUR LA SANTÉ HUMAINE | 4 |
| Potentiel zoonotique..... | 4 |
| Allergénicité/Toxigénicité | 8 |
| Historique d'utilisation | 8 |
| CARACTÉRISATION DU DANGER..... | 9 |
| INCERTITUDE LIÉE À L'ÉVALUATION DES DANGERS INDIRECTS POUR LA SANTÉ HUMAINE..... | 10 |
| ÉVALUATION DE L'EXPOSITION | 11 |
| APERÇU | 11 |
| IMPORTATION | 12 |
| INTRODUCTION DE L'ORGANISME | 13 |
| DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT | 14 |
| AUTRES UTILISATIONS POTENTIELLES | 15 |
| CARACTÉRISATION DE L'EXPOSITION | 16 |
| INCERTITUDE LIÉE À L'ÉVALUATION DE L'EXPOSITION À DES RISQUES INDIRECTS POUR LA SANTÉ HUMAINE | 17 |
| CARACTÉRISATION DES RISQUES | 18 |
| UTILISATION DÉCLARÉE..... | 18 |
| AUTRES UTILISATIONS POTENTIELLES | 19 |
| CONCLUSION CONCERNANT L'ÉVALUATION DES RISQUES..... | 19 |
| RÉFÉRENCES CITÉES | 19 |

RÉSUMÉ

Une évaluation des risques indirects pour la santé humaine a été menée sur trois lignées de combattants génétiquement modifiés (*Betta splendens*) connus sous le nom de combattants GloFish^{MD} Moonrise Pink^{MD} (PiBS2019), GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD} (OBS2019), et GloFish^{MD} Electric Green^{MD} (GBS2019) et visés par la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE). Les lignées PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 sont des lignées modifiées de combattants diploïdes, homozygotes ou hémizygotes, dotés de gènes codant pour différentes protéines fluorescentes. Les combattants PiBS2019, OBS2019 et GBS2019, qui, sous la lumière ambiante (y compris la lumière du soleil), apparaissent respectivement en rose, orange ou vert, seront importés des États-Unis pour être utilisés comme poissons d'ornement dans des aquariums domestiques. La présente évaluation des risques portait sur la possibilité que les trois lignées aient des effets nocifs sur les humains au Canada, par rapport aux combattants de type sauvage, en conséquence d'une exposition dans l'environnement, y compris leur utilisation prévue dans les aquariums domestiques. La souche mère, *B. splendens*, est utilisée comme poisson d'aquarium domestique depuis le début des années 1930. Rien ne semble indiquer qu'il existe un risque d'effet nocif sur la santé humaine aux niveaux d'exposition prévus pour la population canadienne découlant de l'utilisation des combattants PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 comme poisson d'ornement d'aquarium ou de toute autre utilisation potentielle répertoriée. En tant que tel, rien ne permet de penser que les combattants PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 présentent plus de risques pour la santé humaine que le type sauvage de *B. splendens*.

INTRODUCTION

L'évaluation des risques indirects pour la santé humaine qui suit a été menée sur les *Betta splendens* PiBS2019, OBS2019, et GBS2019, trois lignées génétiquement modifiées de combattants diploïdes, hémizygotes ou homozygotes, dotés de gènes codant des versions modifiées de protéines fluorescentes rouges, jaunes ou vertes, respectivement. Le combattant, également connu sous le nom de combattant de Siam, est un poisson tropical d'ornement populaire au Canada et dans d'autres parties du monde. L'évaluation des risques porte sur le potentiel d'effets nocifs pour l'humain au Canada des combattants PiBS2019, OBS2019, et GBS2019, comparativement au *B. splendens* de type sauvage, en conséquence d'une exposition dans l'environnement, y compris une exposition en milieu naturel ou dans le cadre de son utilisation prévue (c.-à-d., dans un aquarium domestique). Les combattants PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 sont de couleur rose, orange et verte, respectivement, lorsqu'ils sont exposés à la lumière ambiante, y compris la lumière du soleil, et seront importés des États-Unis pour être utilisés comme poissons d'ornement dans des aquariums domestiques. L'évaluation des risques a été réalisée en application de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE) et du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* (RRSN[O]).

ÉVALUATION DES DANGERS

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES *BETTA SPLENDENS* PiBS2019, OBS2019, ET GBS2019

Nom binomial

Betta splendens PiBS2019, OBS2019, et GBS2019

Taxonomie

| | |
|-------------|------------------------------|
| Règne | Animal |
| Phylum | Cordés |
| Sous-phylum | Vertébrés |
| Superclasse | Actinoptérygiens |
| Classe | Téléostéens |
| Ordre | Perciformes |
| Famille | Osphronemidés |
| Genre | <i>Betta</i> |
| Espèce | <i>Splendens</i> |
| Lignées | PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 |

Synonymes, noms communs et périmés

Synonyme : *Betta splendens* (Regan, 1910)

Noms communs : combattant de Siam, combattant

Noms commerciaux : PiBS2019 – combattant GloFish^{MD} Moonrise Pink^{MD}

OBS2019 – combattant GloFish^{MD} Sunburst Orange^{MD}

GBS2019 – combattant GloFish^{MD} Electric Green^{MD}

Caractérisation et justification de l'identification taxonomique

Les *Betta splendens* PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 sont des lignées de combattants diploïdes, hémizygotés ou homozygotés, génétiquement modifiées, dotées de constructions génétiques qui leur donnent une apparence rose (PiBS2019), orange (OBS2019) ou verte (GBS2019) à la lumière ambiante, y compris au soleil. Les trois lignées sont issues d'une lignée de combattants de couleur claire, une variante pigmentaire créée lors de la domestication de l'espèce.

Les espèces de *Betta* peuvent être classées en deux catégories : le constructeur de nids de bulles et l'incubateur buccal, selon le mode de soins paternels des œufs fécondés et des œufs éclos (Monvises *et al.* 2009; Chailertit *et al.* 2014; Panijpan *et al.* 2014). Panijpan et ses collaborateurs (2014) ont compilé une liste d'espèces de poissons combattants, qui comprend les combattants constructeurs de nids de bulles *B. splendens*, *B. imbellis*, *B. smaragdina*, *B. mahachaiensis*, *B. coccina* et *B. livida* et les incubateurs buccaux *B. apollon*, *B. chloropharynx*, *B. pi*, *B. prima*, *B. pugnax*, *B. simplex* et *B. stigmosa*. Parmi les caractéristiques externes distinctives des constructeurs de nids de bulles, on peut citer l'irisation et la couleur de l'opercule et des écailles du corps, la coloration du corps, ainsi que les barres et les motifs sur les nageoires (Kowasupat *et al.* 2012). Les autres caractéristiques morphologiques distinctives utilisées pour désigner les combattants comprennent la forme du corps, les motifs de couleur, la taille des nageoires, l'irisation des écailles et les différents attributs des nageoires dorsales et caudales (Monvises *et al.* 2009; Kowasupat *et al.* 2012; Panijpan *et al.* 2014; U.S. Fish and Wildlife Service 2019). Chez *B. splendens*, les nageoires pelviennes sont situées sous les pectoraux ou légèrement en avant des pectoraux, les écailles sont larges, disposées régulièrement, la ligne latérale étant vestigiale ou absente (U.S. Fish and Wildlife Service 2019).

Contrairement aux poissons élevés pour le combat, qui sont sélectionnés pour leur corps imposant et fort doté d'écailles dures (cibles renforcées) mais de nageoires plus petites (cibles fragiles) en guise de protection contre les morsures de l'adversaire, les caractéristiques privilégiées chez les combattants d'ornement sont les variations d'intensité de la couleur, les motifs de couleur, l'irisation des écailles, la forme du corps et la taille des nageoires (Monvises *et al.* 2009; Valentin *et al.* 2013).

Historique des souches

Les lignées déclarées PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 ont été produites par micro-injection de cassettes d'expression contenant les transgènes correspondants dans des œufs de *B. splendens* de couleur claire. Après l'éclosion, les lots d'alevins sont testés pour évaluer la fluorescence de la couleur du gène inséré. Des précisions concernant le développement des souches et l'historique des lignées déclarées ont été fournies par la société, aux seules fins de l'examen et de l'évaluation des risques en cours, mais ces renseignements sont désignés

comme des renseignements commerciaux confidentiels et ne figurent pas dans le présent rapport.

Les stocks de géniteurs pour les lignées PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 sont conservés séparément, le même protocole de reproduction étant utilisé pour les trois lignées.

Modifications génétiques : but, méthode, modifications génétiques et phénotypiques

Les lignées déclarées qui ont été modifiées pour afficher une couleur rose (PiBS2019), orange (OBS2019) ou verte (GBS2019) sous la lumière ambiante, y compris la lumière du soleil, sont uniquement destinées à un usage par le grand public à des fins d'exposition dans un aquarium domestique. Comme pour le *B. splendens* de type sauvage, qui est une espèce non alimentaire utilisée en toute sécurité dans les aquariums du monde entier depuis environ 90 ans, les lignées PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 ne sont pas destinées à un usage alimentaire.

Selon les renseignements fournis par la société déclarante, outre le fait que les poissons PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 apparaissent respectivement en rose, orange et vert sous la lumière ambiante, les trois lignées ont un taux de réussite de la reproduction inférieur à celui de leurs frères et sœurs combattants non transgéniques. La société déclarante a également fourni les résultats d'un test de tolérance à la température qui a montré une sensibilité légèrement accrue aux basses températures pour les trois lignées par rapport aux combattants non transgéniques. Ces données, ajoutées aux essais de reproduction, indiquent que la viabilité ne diffère pas entre les lignées transgéniques et non transgéniques. La démarche adoptée pour produire, élever et préparer les lignées déclarées pour la vente est considérée adéquate pour assurer la stabilité génétique du stock de géniteurs. Il convient toutefois de souligner que l'utilisation d'une nucléase Cas9 et d'un ARN guide dans le développement des lignées déclarées peut entraîner des mutations hors cible avec des effets inconnus sur le génome du combattant.

Propriétés biologiques et écologiques

Les combattants sont originaires d'Asie du Sud-Est, *B. splendens* étant la plus célèbre des 91 espèces (Srikulnath *et al.* 2021). Leurs habitats naturels sont constitués de petites étendues d'eau, telles que des rizières, des étangs, des lagunes et des marais offrant une végétation abondante, qui leur assure un couvert contre les oiseaux piscivores (Jaroensutasinee et Jaroensutasinee 2001; Monvises *et al.* 2009; Pleeging et Moons 2017). Selon Jaroensutasinee et Jaroensutasinee (2001), les masses d'eau peu profondes et les zones marginales des rizières se caractérisent par une température élevée (27 à 31,5 °C), un faible taux d'oxygène dissous (0 à 7,39 mg/L), un taux élevé de CO₂ libre (0,45 à 1,91 mg/L), une faible salinité et un pH acide (5,28 à 5,80). Les combattants possèdent un labyrinthe qui leur permet de consommer l'oxygène de l'air et ils sont capables de survivre dans une eau dont le taux d'oxygène ne dépasse pas 0 à 2 ppm (Pleeging et Moons 2017).

Les poissons sauvages sont de couleur brun-vert et mesurent de 5 à 5,5 cm de long, tandis que les poissons domestiqués sont produits dans une grande variété de couleurs et peuvent atteindre 6 à 6,5 cm de long (Pleeging et Moons 2017). Les combattants sont carnivores et préfèrent les proies vivantes et mobiles, comme les minuscules organismes infusoires, les puces d'eau, les vers de vase et surtout les larves de moustiques (Monvises *et al.* 2009, Pleeging et Moons 2017).

Les combattants, en particulier les mâles, sont considérés comme des poissons territoriaux et ils défendent agressivement leur territoire (Castro *et al.* 2006, Pleeging et Moons 2017). Dans la nature, les mâles vont établir un territoire d'environ 1,7 mètre carré (Dzieweczynski

et al. 2017). Les combattants femelles préfèrent se regrouper avec d'autres femelles et, à l'exception des 24 heures précédant l'accouplement, vont préférer la solitude à la présence d'un mâle (Dzieweczynski *et al.* 2017; Plegging et Moons 2017).

Le style de reproduction se caractérise par la construction de nids à bulles, où les œufs et les larves sont gardés et défendus par le mâle (Srikulnath *et al.* 2021). La création d'un nid à bulles est considérée comme un signe de bien-être chez les mâles, et il a été observé qu'ils ne construisent pas de nids à des températures de l'eau inférieures à 24,4 °C ou supérieures à 27,7 °C, la température optimale rapportée étant de 26,6 °C (Plegging et Moons 2017). Les nids sont construits par le mâle, qui souffle des bulles autour d'une base flottante. La femelle pondra environ 400 à 500 œufs sous le nid pendant que le mâle attend pour les féconder. Le succès de la reproduction dépendra de la taille du nid, car les nids plus gros peuvent accueillir plus d'œufs fécondés et faciliter une oxygénation efficace (Srikrishnan *et al.* 2017). *B. splendens* a une période de développement embryonnaire relativement courte, puisque les œufs éclosent environ 36 heures après la fécondation (Murcia-Ordoñez *et al.* 2016). Les vésicules vitellines sont totalement absorbées 73 heures après l'éclosion, la métamorphose étant achevée 768 heures après l'éclosion lorsque les larves deviennent des juvéniles (Valentin *et al.* 2015). La maturité sexuelle peut être atteinte à environ 75 jours, les mâles commençant à construire des nids dès 53 jours (Rainwater 1967). Les mâles se distinguent morphologiquement des femelles environ 2 mois après l'éclosion, et doivent être séparés des autres mâles à 4 mois pour éviter les combats (Monvises *et al.* 2009).

EFFETS SUR LA SANTÉ HUMAINE

Potentiel zoonotique

Bien que rares, des cas d'infections zoonotiques découlant d'un contact avec des poissons tropicaux d'ornement ont été signalés, en plus de zoonoses indirectes attribuables à l'ingestion d'aliments ou d'eau potable contaminés par des agents pathogènes et des parasites associés à des poissons d'ornement ou d'aquarium. Il existe peu de signalements de zoonoses causées par des agents pathogènes parasitaires, fongiques et viraux provenant d'organismes aquatiques, les bactéries étant signalées comme les principaux agents étiologiques des infections zoonotiques (Iqbal *et al.* 2018). Les maladies bactériennes sont extrêmement courantes chez les poissons d'ornement et sont le plus souvent attribuables à des bactéries omniprésentes dans le milieu aquatique et qui agissent comme pathogènes opportunistes découlant du stress (Roberts *et al.* 2009). Le contact est la principale voie de transmission d'infections bactériennes à l'humain, lesquelles résultent de la manipulation d'organismes aquatiques (Lowry et Smith 2007). Les jeunes enfants, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées présentent un risque plus élevé de contracter ces infections (Dinç *et al.* 2015). Les enfants sont également plus susceptibles d'être atteints d'une maladie grave que les adultes, car leur hygiène est souvent moins rigoureuse (Dunn *et al.* 2015). Si la plupart des infections sont autolimitatives, les cas plus graves sont associés à une déficience immunitaire, à une infection par des souches très virulentes, à un contact avec un inoculum important, à la profondeur de la pénétration cutanée ou à une combinaison de ces facteurs (Haenen *et al.* 2020). Les espèces bactériennes les plus communes associées aux poissons tropicaux et en mesure de provoquer des maladies humaines sont *Aeromonas* spp., *Mycobacterium marinum*, *Salmonella* spp. et *Streptococcus iniae* (CDC 2015), et la plupart des infections signalées sont associées à *M. marinum* (Weir *et al.* 2012).

Les recherches internes de la littérature scientifique n'ont permis de recenser aucun signalement de zoonose ou d'autres effets nocifs attribuables aux lignées déclarées ou à d'autres lignées GloFish^{MD} disponibles dans le commerce. Cependant, la littérature scientifique

fait état d'un cas de zoonose impliquant le type sauvage de *B. splendens*. Cassetty et Sanchez (2004) ont signalé un cas d'infection par *Mycobacterium marinum* chez un homme de 49 ans de l'état de New York qui possédait un aquarium contenant une paire de combattants. Le cas concernait des nodules sur le dos de la main droite de l'homme qui sont réapparus trois mois après un traitement réussi à l'aide de plusieurs antibiotiques. Les cultures réalisées ont permis d'identifier *Mycobacterium marinum* et donnaient un résultat négatif pour d'autres bactéries et champignons. Avec la réapparition des nodules, un nouveau régime d'antibiotiques multiples différents a été entrepris. Il convient de souligner que l'homme a déclaré porter des gants lorsqu'il nettoyait l'aquarium; cependant, il prenait également des médicaments pour des antécédents médicaux liés notamment à un diabète sucré et une coronaropathie.

Chez l'humain, *M. marinum* est l'agent responsable du « granulome des aquariums », qui entraîne des lésions cutanées ulcéreuses ou l'apparition de nodules granulomateux. Ces lésions sont généralement limitées aux extrémités distales comme les mains, les jambes et les pieds, car la température de croissance optimale de *M. marinum* varie entre 26 °C et 32 °C (Mutoji et Ennis 2012; Gauthier 2015). Toutefois, ces lésions cutanées nodulaires peuvent évoluer vers la ténosynovite, l'arthrite ou l'ostéomyélite (Hashish *et al.* 2018). De plus, de rares cas de mycobactériose systémique ont été signalés chez des personnes immunodéprimées (Lowry et Smith 2007). Les infections sont généralement contractées lorsque des blessures et des abrasions cutanées sont exposées à de l'eau contaminée (Gauthier 2015). Chez l'humain, la mycobactériose est classée en 4 types (I à IV). Le type I se voit chez les patients immunocompétents avec des signes cliniques comprenant des lésions superficielles accompagnées de nodules croûteux et ulcérés ou des plaques verruqueuses. Les lésions sont constituées de petites papules indolores de couleur rouge-bleuâtre mesurant environ 1 à 2 cm de diamètre. Les signes se développent sur quelques semaines ou quelques mois. Le type II survient chez les personnes immunodéprimées et comporte des lésions avec abcès, nodules inflammatoires et granulomes. Les lésions peuvent être des granulomes sous-cutanés uniques ou multiples, avec ou sans ulcération. Dans le type III, les infections se produisent dans les tissus profonds avec ou sans lésions cutanées avec des signes cliniques comprenant l'arthrite, la ténosynovite, l'ostéomyélite et la bursite. Le type IV est très rare, mais peut se produire chez les patients souffrant d'une maladie pulmonaire (Delghandi *et al.* 2020).

Il est probable que presque toutes les espèces de poissons soient sensibles à *Mycobacterium* sp. avec des niveaux de mortalité allant de 10 % à 100 % des poissons infectés (Delghandi *et al.* 2020). D'autres exemples d'espèces de *Mycobacterium* qui causent des infections chez les poissons comprennent *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, et *M. peregrinum* (Cardoso *et al.* 2019; Pate *et al.* 2019; Puk et Guz 2020). Si *M. fortuitum* et *M. marinum* sont le plus souvent isolés chez les combattants (Pleeging et Moons 2017), *M. chelonae*, *M. gordonae*, et *M. kansasii* ont également été isolés chez *B. splendens* (Řehulka *et al.* 2006). Une étude de Sirimalaisuwan *et al.* (2017) a révélé que 5,5 % des *B. splendens* cliniquement sains étaient porteurs de *M. marinum* et pourraient donc jouer un rôle comme source d'infections mycobactériennes chez les amateurs de poissons d'ornement.

Bien que la plupart des cas d'infections liées aux poissons chez l'homme soient causés par *M. marinum*, les aquariophiles amateurs doivent également être conscients du potentiel zoonotique d'autres espèces de *Mycobacterium* (Puk et Guz 2020). Chez les personnes immunodéprimées et les enfants, *M. haemophilum* a été signalé comme étant associé à des infections sous-cutanées, à la lymphadénite, à l'arthrite septique, à l'ostéomyélite, à la pneumonite et aux maladies disséminées (Emmerich *et al.* 2019; Franco-Paredes *et al.* 2019). Cameselle-Martínez *et al.* (2007) ont signalé une infection cutanée par *M. haemophilum* à la suite d'une morsure de poisson d'aquarium chez un patient gravement immunodéprimé atteint

du sida. L'infection a été traitée avec succès après un traitement combiné de six antibiotiques. *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* et *M. peregrinum* sont également associés à des infections cutanées chez l'humain (Kamijo *et al.* 2012; Franco-Paredes *et al.* 2019). Li *et al.* (2014) ont fait état d'un traitement efficace par antibiotiques d'une infection cutanée à *M. chelonae* située sur le bras gauche d'une femme de 82 ans qui pratiquait l'élevage de poissons tropicaux dans ses loisirs. Bien que les infections mycobactériennes cutanées puissent être guéries avec succès au moyen d'antibiotiques, le choix des combinaisons antibactériennes et la durée du traitement dépendent de l'espèce (Franco-Paredes *et al.* 2018).

Les infections zoonotiques dues à *S. iniae* sont opportunistes et ont le plus souvent été associées à des plaies punctiformes attribuables à la manipulation et à la préparation de poissons infectés par des personnes présentant des conditions médicales sous-jacentes comme le diabète sucré, un rhumatisme cardiaque chronique ou une cirrhose (Baiano et Barnes 2009; Haenen *et al.* 2020). Lors de la manipulation de poissons infectés vivants ou récemment morts, *S. iniae* peut provoquer une maladie grave, notamment une septicémie, une endocardite, de l'arthrite, une méningite, de la fièvre, une distension abdominale et une pneumonie (Lowry et Smith 2007; Boylan 2011; Gauthier 2015; Haenen *et al.* 2020). Les personnes ayant un système immunitaire affaibli ou présentant des plaies ouvertes pourraient être infectées par *S. iniae* lorsqu'elles manipulent des poissons ou nettoient un aquarium (CDC 2015). Toutefois, la documentation scientifique ne fait état d'aucune infection à streptocoques chez l'être humain attribuée au combattant à la suite d'une exposition à un aquarium domestique.

Aeromonas spp. sont des pathogènes opportunistes qui sont associés à un certain nombre de maladies chez les poissons d'ornement (Hossain *et al.* 2018). Avec *A. sobria* et *A. caviae*, *Aeromonas hydrophila* est l'aéromonade dont le potentiel zoonotique a été le plus souvent signalé (Boylan 2011). Kanchan *et al.* (2019) ont fait état du potentiel de virulence d'*A. hydrophila* chez les *B. splendens* en bonne santé. Après des injections abdominales de $7,5 \times 10^7$ ou de $7,5 \times 10^5$ d'unités formant des colonies par 0,05 ml ou d'une solution saline témoin, les auteurs ont signalé une mortalité cumulée sur deux semaines après l'injection de 98,33 %, 20 % et 0 %, respectivement, pour les groupes. Les eaux qui présentent une teneur élevée en éléments nutritifs peuvent favoriser des proliférations de bactéries pouvant infecter les humains en présence de lésions ou en cas d'ingestion; ces infections sont toutefois rares et touchent ordinairement des personnes immunodéprimées (Boylan 2011). Chez l'homme, l'exposition à *A. hydrophila* peut entraîner des infections cutanées locales et, parfois, une maladie diarrhéique (Haenen *et al.* 2020). *A. hydrophila* était l'une des espèces de bactéries isolées d'écouvillons nasopharyngés d'un garçon de 11 mois atteint de fibrose kystique (Cremonesini et Thomson 2008). Les auteurs pensent que l'infection était le résultat d'une propagation par aérosol de la bactérie attribuable au processus d'aération des aquariums de la maison, car les isolations d'*A. hydrophila* n'ont cessé qu'après le retrait des aquariums. Bien que Cremonesini et Thomson (2008) n'aient pas nommé l'espèce de poisson, il n'y a pas de cas rapporté d'infections zoonotiques à *A. hydrophila* attribuées à une exposition à *B. splendens*. Parmi les *Aeromonas* spp. pathogènes, *A. veronii* semble présenter la plus vaste gamme d'hôtes, car des espèces allant des invertébrés aux mammifères, y compris les humains, ont montré une sensibilité à cet agent pathogène (Lazado et Zilberg 2018). Toutefois, une recherche documentaire effectuée à l'interne n'a révélé aucun cas d'infection zoonotique à *A. veronii* à la suite d'une exposition à des poissons d'ornement.

Une infection à *Salmonella* peut survenir en cas de contact avec l'habitat d'un animal, comme un aquarium (CDC 2015). Bien que *Salmonella* ne soit pas un agent pathogène connu chez les poissons tropicaux, ceux-ci peuvent servir de réservoir bactérien et excréter *Salmonella* dans leurs excréments en période de stress (Gaulin *et al.* 2005). Musto et ses collaborateurs (2006)

ont recensé en Australie 78 cas d'infections par la bactérie *Salmonella paratyphi* B, variant Java, chez des personnes qui possédaient des aquariums contenant des poissons tropicaux. Les infections touchaient surtout des enfants (l'âge médian des cas était de trois ans) qui avaient été exposés à l'eau d'un aquarium, et ont causé de la diarrhée, de la fièvre, des crampes abdominales, des vomissements, des selles sanguinolentes, des maux de tête et des myalgies. Les types de poissons tropicaux signalés dans cette étude étaient notamment les tétras, les guppys et les anges de mer. De même, sur 53 cas déclarés d'infections à *S. paratyphi* B, var. Java, rapportés dans la province de Québec de janvier 2000 à juin 2003, 33 personnes infectées étaient propriétaires d'un aquarium et 21 des tests de dépistage pour aquariums avaient obtenu des résultats positifs à *Salmonella* (Gaulin *et al.* 2005). Bien que les auteurs n'aient pas nommé les espèces de poissons tropicaux, le rapport indique que la Thaïlande est l'une des sources des poissons tropicaux présents au Québec. Une recherche documentaire interne n'a révélé aucun cas d'infection zoonotique à *Salmonella* attribuée à une exposition à *B. splendens*.

Les infections zoonotiques surviennent principalement en présence de plaies, de coupures, d'éraflures, d'égratignures ou d'irritations de la peau (Boylan 2011). Il est possible de prévenir ces infections en portant des gants au moment de manipuler les poissons ou de nettoyer les aquariums, et en évitant tout contact avec de l'eau potentiellement contaminée pour les personnes ayant des plaies ouvertes. Il est également fortement recommandé de se laver les mains et la peau avec de l'eau savonneuse après tout contact avec de l'eau d'aquarium et des poissons. En outre, les personnes dont le système immunitaire est déprimé ou qui souffrent de pathologies sous-jacentes, de même que les enfants, devraient éviter de nettoyer des aquariums ou de manipuler des poissons (Haenen *et al.* 2013; 2020).

Aucun rapport n'associe spécifiquement les organismes déclarés ou le type sauvage de *B. splendens* à des parasites ayant des effets significatifs sur la santé humaine. Des évaluations sanitaires de routine (nécropsie, microbiologie) ont été réalisées sur des échantillons limités de six poissons de chaque couleur, ainsi que sur six combattants non transgéniques, et une histologie a été réalisée sur six autres poissons de chaque couleur en plus de six poissons non transgéniques dans un laboratoire de diagnostic des maladies des poissons de l'Université de Floride en 2018 (GBS2019), 2019 (PiBS2019 et OBS2019) et 2020 (albinos, non transgéniques).

La société déclarante a fourni une lettre du vétérinaire ayant participé à l'étude sur le GBS2019, qui indiquait que les poissons fluorescents ne présentaient pas de morphologies générales différentes de celles observées chez leurs homologues de type sauvage. En outre, le vétérinaire a déclaré qu'il n'avait observé aucun signe d'une différence de sensibilité aux agents pathogènes ou de transmission de ceux-ci. Les parasites monogènes et ciliés rapportés dans ces études ont été précédemment isolés de *B. splendens*; de plus, les parasites peuvent être couramment décelés chez les poissons d'ornement (Florindo *et al.* 2017a,b; Iqbal *et al.* 2018; Trujillo-González *et al.* 2018). En outre, aucune croissance bactérienne n'a été observée après 48 heures (à 28 °C) dans les échantillons de cerveau et de rein antérieur placés sur des plaques de gélose au sang pour les quatre groupes. La société déclarante a également fourni une procédure opérationnelle normalisée de contrôle de la qualité (CQ), précisant que les poissons qui quittent les installations des producteurs sont inspectés pour détecter les signes comportementaux et physiques de maladie avant d'être expédiés aux vendeurs et aux distributeurs. Si un lot ne répond pas aux normes de CQ, l'expédition de poissons de ce lot est annulée.

Allergénicité/Toxicité

Des analyses internes des séquences d'acides aminés de toutes les protéines fluorescentes exprimées ont été effectuées à l'aide de la base de données [AllergenOnline](#) (v21; 14 février 2021). Comme pour les analyses précédentes sur ces protéines fluorescentes réalisées sur les lignées GloFish^{MD} précédemment déclarées, aucune correspondance présentant une identité supérieure à 35 %, ni aucune correspondance exacte pour les segments de 80 et de 8 acides aminés, respectivement, n'a été trouvée pour l'une ou l'autre des protéines fluorescentes. Les analyses menées pour tous les autres cadres de lecture ont permis de constater le même résultat positif avec une fenêtre glissante de 80mer pour un cadre de lecture ouvert (ORF) putatif dans le sens 5' → 3' (cadre 1) dans les séquences de la cassette d'expression pour GBS2019 et OBS2019. On a constaté que cet ORF présentait une identité de 35,03 % avec une protéine isoforme X1 de la chaîne de collagène alpha-1(I) du barramundi (*Lates calcarifer*). Cependant, l'alignement complet n'a donné lieu qu'à une identité de 35,4 % et la valeur E (valeur d'attente) était élevée, soit 99. La réactivité croisée exige généralement que les correspondances soient identiques à 40 % sur 80 acides aminés, avec un score de valeur E de 1e à -15 ou moins (M. Richard Goodman, Université de Lincoln-Nebraska, communication personnelle). Ainsi, la réactivité croisée allergique est peu probable pour l'ORF putatif. De plus, l'analyse BLAST (outil de recherche d'alignement local de base) sur la séquence d'acides aminés avec BLASTP n'a révélé aucune similitude significative avec une protéine connue. Les analyses des séquences nucléotidiques insérées pour prédire les sites d'initiation de la traduction à l'aide d'un [programme en ligne](#) n'a permis de trouver que des sites associés aux protéines fluorescentes attendues. Par conséquent, cet ORF putatif n'aboutirait très probablement pas à une protéine exprimée chez OBS2019 ou GBS2019.

L'identité de 35 % pour les segments de 80 acides aminés est suggérée par la Commission du Codex Alimentarius pour évaluer les protéines nouvellement exprimées produites par les plantes à ADN recombiné (OMS/FAO 2009). De même, les résultats fournis par la société déclarante à partir d'analyses utilisant le [site Web Allermatch](#) n'ont décelé aucune correspondance pour les alignements par fenêtre glissante de 80 acides aminés utilisant le seuil de 35 % ou les correspondances exactes utilisant des segments de 8 acides aminés.

Les analyses BLAST des séquences de protéines fluorescentes insérées n'ont révélé aucune homologie avec des séquences de toxines ou d'allergènes potentiels. Aucun effet nocif n'a été observé chez des rats mâles alimentés avec de la protéine vert fluorescent (GFP) pure ou avec du canola exprimant la protéine GFP pendant 26 jours (Richards *et al.* 2003). En outre, rien n'indique que les lignées PiBS2019, OBS2019, GBS2019 ou le *B. splendens* pourraient produire des matières toxiques ou autres matières dangereuses susceptibles de s'accumuler dans l'environnement ou d'être absorbées par d'autres organismes dans l'environnement.

Historique d'utilisation

GBS2019 a fait l'objet en 2019 d'une décision de la Food and Drug Administration des États-Unis (USFDA) relativement au pouvoir discrétionnaire d'application et est disponible commercialement aux États-Unis depuis le début de 2020. Les lignées PiBS2019 et OBS2019 ont obtenu leur pouvoir discrétionnaire d'application de l'USFDA en novembre 2020. Les protéines fluorescentes utilisées dans les lignées GBS2019 et OBS2019 ont été utilisées dans d'autres lignées GloFish^{MD} dès 2006, et la protéine fluorescente présente dans PiBS2019 est utilisée depuis plus de sept ans. Les combattants de type sauvage sont vendus comme poissons d'aquarium depuis les années 1930 (Innes 1935; Wallbrunn 1958).

CARACTÉRISATION DU DANGER

Le potentiel de danger pour la santé humaine présenté par les combattants PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 est jugé faible (tableau 1) pour les raisons suivantes :

1. Les combattants PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 sont des poissons tropicaux génétiquement modifiés contenant de multiples copies de constructions transgéniques dans un seul site d'insertion (bien qu'il puisse y avoir d'autres modèles d'insertion dans la population), lesquelles sont intégrées de manière stable grâce à de multiples croisements.
2. Les méthodes utilisées pour produire les combattants PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 ne soulèvent aucune préoccupation indirecte pour la santé humaine. Cependant, le potentiel d'effets hors cible liés à l'utilisation d'une nucléase Cas9 et d'un ARN guide reste inconnu. Même si certains des organismes sources d'où provient le matériel génétique inséré semblent produire des toxines, rien n'indique que le matériel génétique inséré ou les protéines exprimées dans ces lignées soient associés à une toxicité ou à une pathogénicité chez les humains.
3. Bien que des cas d'infections zoonotiques associées aux poissons tropicaux d'aquarium aient été signalés, en particulier chez des personnes immunodéprimées et des enfants, aucun cas n'a été attribué à l'une ou l'autre des lignées de GloFish^{MD} disponibles dans le commerce, y compris le GBS2019. Le potentiel zoonotique des lignées PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 ne devrait pas être différent de celui des combattants de type sauvage actuellement offerts dans le commerce.
4. L'identité de séquence des transgènes insérés ne correspond à aucun allergène connu ni à aucune toxine connue. Les séquences d'acides aminés des trois protéines fluorescentes sont identiques à celles utilisées dans les lignées GloFish^{MD} évaluées précédemment. Bien que les analyses effectuées sur les autres cadres de lecture potentiels aient relevé la même correspondance potentielle pour OBS2019 et GBS2019, les résultats indiquent qu'il y a peu de preuves d'une réactivité croisée.
5. Bien qu'il n'y ait pas d'historique d'utilisation sûre aux États-Unis pour PiBS2019 et OBS2019, et un historique limité d'utilisation sûre pour GBS2019, en raison de leur introduction récente, l'espèce de type sauvage est utilisée en toute sécurité comme poisson d'aquarium ornemental depuis les années 1930. En outre, il existe un historique d'utilisation sûre pour les autres lignées de GloFish^{MD} offertes dans le commerce.

Tableau 1 : Considérations relatives à la gravité du danger (pour la santé humaine)

| DANGER | FACTEURS À CONSIDÉRER |
|---------------|--|
| Élevé | <ul style="list-style-type: none">• Les effets chez l'humain en bonne santé sont graves, durent longtemps ou provoquent des séquelles ou la mort.• Les traitements prophylactiques n'existent pas ou ne présentent que peu de bienfaits.• Risque élevé d'effets à l'échelle communautaire. |
| Modéré | <ul style="list-style-type: none">• Les effets sur la santé humaine devraient être modérés, mais rapidement résolus chez les personnes en bonne santé ou grâce à des traitements prophylactiques efficaces.• Risque possible d'effets à l'échelle communautaire. |
| Faible | <ul style="list-style-type: none">• Aucun effet sur la santé humaine ou effets légers, asymptomatiques ou bénins chez les personnes en bonne santé.• Il existe des traitements prophylactiques efficaces.• Aucun risque d'effets à l'échelle communautaire. |

INCERTITUDE LIÉE À L'ÉVALUATION DES DANGERS INDIRECTS POUR LA SANTÉ HUMAINE

Le tableau 2 présente le classement de l'incertitude liée à l'évaluation des dangers indirects pour la santé humaine. Des renseignements adéquats fournis par l'entreprise déclarante ou tirés d'autres sources ont confirmé l'identification des organismes déclarés. Des renseignements appropriés ont également été fournis pour décrire en détail les méthodes utilisées pour modifier génétiquement le type sauvage de *B. splendens*, y compris les sources du matériel génétique et la stabilité des génotypes et phénotypes obtenus. Les analyses de la séquence des constructions transgéniques insérées pour les trois lignées déclarées ne correspondaient à aucune toxine, et aucun effet nocif attribué aux protéines insérées n'a été signalé chez les humains.

Bien qu'aucun effet nocif sur la santé humaine directement associé aux organismes déclarés n'ait été signalé, des données de substitution tirées de la littérature scientifique sur d'autres poissons d'ornement indiquent qu'il y a une possibilité de transmission d'agents pathogènes pour les humains. Toutefois, de tels cas d'infection sont communs à tous les poissons d'ornement d'aquarium et ils ne sont pas uniques aux combattants. Bien que la production commerciale de ces trois lignées soit récente, les protéines fluorescentes insérées sont utilisées dans d'autres lignées de GloFish^{MD} depuis plusieurs années, et aucun effet indésirable sur la santé humaine n'a été signalé. Par conséquent, en combinant à la fois des données empiriques sur les organismes déclarés, des données de substitution tirées de la littérature scientifique sur d'autres poissons d'ornement d'aquarium, et l'absence d'effets nocifs corroborée par l'historique d'utilisation sans danger pour d'autres lignées de GloFish^{MD}, les risques indirects pour la santé humaine des lignées PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 sont évalués comme étant **faibles** avec une **faible incertitude**. Cependant, il existe une possibilité théorique que des mutations hors cible résultant de l'utilisation d'une nucléase Cas9 et d'un ARN guide puissent produire des effets inconnus, comme des protéines altérées présentant une allergénicité accrue, bien que cela n'ait pas été observé chez d'autres modèles. Par conséquent, on ne s'attend pas à ce que cette possibilité modifie la cote de danger. Elle augmente l'incertitude, mais pas suffisamment pour que la cote dépasse le niveau faible. On considère qu'il existe une faible incertitude parce qu'une grande partie des renseignements relatifs aux effets sur la santé humaine proviennent de rapports portant sur d'autres poissons d'ornement, qu'il n'existe pas d'historique d'utilisation sans danger pour ces lignées déclarées, et qu'aucune étude portant expressément sur les effets potentiels du poisson d'ornement transgénique fluorescent sur la santé humaine n'a été réalisée.

Tableau 2 : Catégorisation du danger indirect pour la santé humaine lié à l'incertitude.

| Description | Classement du niveau d'incertitude |
|---|------------------------------------|
| Il existe de nombreux signalements d'effets sur la santé humaine liés au danger, et la nature et la gravité des effets signalés sont cohérentes (c.-à-d. faible variabilité); OU Le potentiel d'effets sur la santé des personnes exposées à l'organisme a fait l'objet d'une surveillance et aucun effet n'a été signalé. | Négligeable |
| Il existe quelques signalements d'effets sur la santé humaine liés au danger, et la nature et la gravité des effets signalés sont relativement cohérentes; OU | Faible |

| Description | Classement du niveau d'incertitude |
|--|------------------------------------|
| Aucun effet sur la santé humaine n'a été signalé et aucun effet lié au danger n'a été signalé chez d'autres mammifères. | |
| Il existe quelques signalements d'effets sur la santé humaine qui peuvent être liés au danger, mais la nature et la gravité des effets signalés sont incohérentes; OU Des effets liés au danger ont été signalés chez d'autres mammifères, mais pas chez les êtres humains. | Modérée |
| Il existe des lacunes importantes dans les connaissances (p. ex. quelques signalements d'effets chez des personnes exposées à l'organisme, mais ces effets n'ont pas été attribués à l'organisme). | Élevée |

ÉVALUATION DE L'EXPOSITION

APERÇU

Comme l'illustrent les voies d'exposition humaine généralisées de la figure 1, on suppose que les principales voies d'exposition humaine de PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 sont les suivantes :

- a. pendant l'importation depuis les États-Unis et la distribution aux détaillants au Canada;
- b. introduction au Canada par l'utilisation prévue comme poisson d'ornement dans les aquariums domestiques;
- c. exposition par le biais de l'environnement et du devenir dans l'environnement à la suite de rejets accidentels, délibérés ou involontaires dans l'environnement;
- d. autres utilisations potentielles.

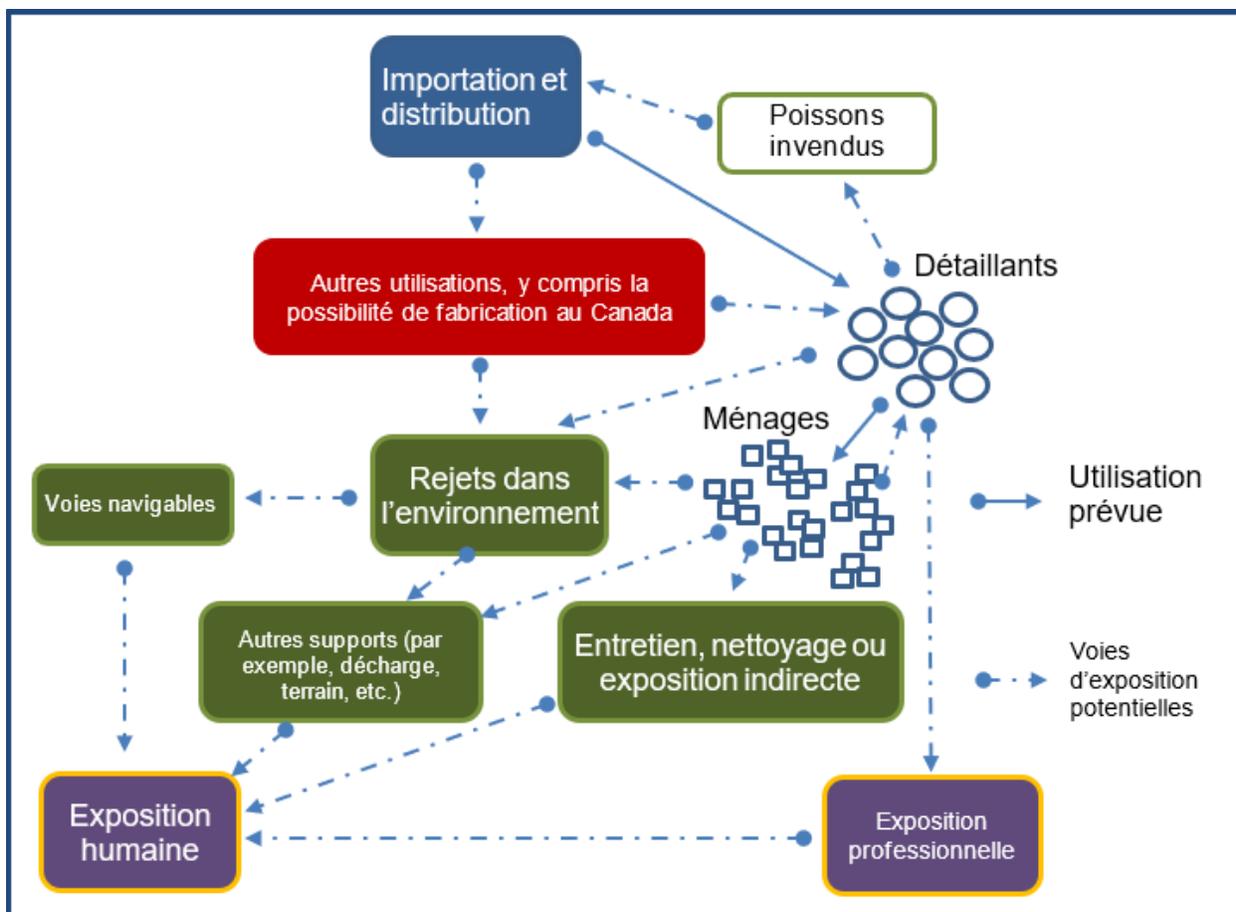


Figure 1 : Voies d'exposition humaine généralisées pour PiBS2019, OBS2019, et GBS2019

IMPORTATION

Les poissons adultes importés des États-Unis entreront au Canada par différents points d'entrée qui n'ont pas encore été déterminés. Les géniteurs sont conservés séparément en Floride, aux États-Unis, le même protocole de reproduction étant utilisé pour tous les types de poissons F₂ qui deviennent les lignées indiquées comme les lignées PiBS2019, OBS2019 et GBS2019. Aux États-Unis, la production des lignées déclarées est réglementée par la Division de l'aquaculture du Département de l'agriculture et des services aux consommateurs de la Floride afin d'assurer l'utilisation de pratiques de gestion exemplaires et de protéger l'environnement. Selon la société déclarante, des poissons adultes seront expédiés à des distributeurs canadiens qui les distribueront ensuite aux animaleries pour vente au grand public. Les lignées déclarées seront livrées aux détaillants en fonction des quantités commandées, et y seront conservées jusqu'à leur vente.

La société déclarante prévoit commercialiser les poissons PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 au Canada dans environ 500 points de vente au détail où sont vendus des poissons d'aquarium ornementaux. Bien que l'emplacement et le nombre exact des lieux où les organismes déclarés seront disponibles à la vente ne soient pas connus à l'heure actuelle, les poissons seront principalement vendus comme poissons d'ornement à confiner à l'intérieur d'aquariums dans les foyers et les commerces de détail. Pour l'utilisation prévue, l'exposition humaine pourrait se produire pendant la distribution, notamment lors du transport du poisson par l'importateur, ainsi que pendant le stockage, la manipulation et la vente par le détaillant. D'après une enquête

menée auprès de propriétaires de magasins à Montréal (Québec), les poissons sont conservés et mis en vente par les détaillants jusqu'à ce qu'ils soient vendus ou retournés au distributeur et sont moins susceptibles d'être rejetés dans l'environnement par les détaillants (Gertzen *et al.* 2008). Puisque les détaillants ne sont pas censés être les utilisateurs finaux des poissons PiBS2019, OBS2019 et GBS2019, l'exposition humaine pendant l'importation et la distribution aux détaillants devrait être majoritairement de nature professionnelle.

INTRODUCTION DE L'ORGANISME

Les aquariophiles amateurs qui achètent les lignées déclarées directement auprès des détaillants, ou qui les reçoivent d'autres aquariophiles, feront très probablement l'objet d'une exposition cutanée par contact avec les poissons déclarés lors des activités d'entretien comme les changements d'eau et le nettoyage des aquariums. L'estimation de l'ampleur de l'exposition humaine dans le cadre de l'utilisation prévue, c'est-à-dire comme poisson d'ornement dans les aquariums domestiques, nécessite une connaissance de la densité de charge par ménage et du nombre de ménages prévoyant acheter les lignées déclarées. D'après les informations fournies par la société déclarante, la capacité de charge habituelle pour les combattants de type sauvage dans les aquariums domestiques est d'un mâle ou d'une femelle par aquarium, ou de plusieurs femelles. L'expérience du marché américain communiquée par la société déclarante indique que les consommateurs possèdent plus d'un aquarium de combattants. Bien que la proportion d'aquariophiles amateurs prévoyant acheter des PiBS2019, des OBS2019 et des GBS2019 ne soit pas connue, une enquête de 2009 a permis d'estimer que 12 % des ménages canadiens possédaient des poissons (Perrin 2009; Whitfield et Smith 2014); une autre enquête (Marson *et al.* 2009) a rapporté qu'environ 28 % des répondants avaient des combattants dans leurs aquariums. Dans une autre étude réalisée à Montréal, Québec (Gertzen *et al.* 2008), on a signalé qu'environ 2,4 % des poissons vendus par les animaleries étaient des combattants de Siam (*Betta splendens*). Selon le recensement de 2016, le Canada compte 14 millions de ménages (Statistique Canada 2017). Si l'on rassemble ces chiffres, environ un demi-million de foyers canadiens possèdent des combattants (28 % possèdent des combattants sur les 12 % possédant des poissons d'ornement parmi les 14 millions de foyers). En considérant une densité de charge d'au moins un mâle et une femelle, il y aurait environ un million de combattants au Canada.

Selon les informations fournies par la société déclarante, les aquariums domestiques utilisés pour *B. splendens* et d'autres types similaires de poissons d'aquarium tropicaux sont généralement maintenus à des températures comprises entre 20 et 30 °C, ce qui reflète les températures des eaux tropicales associées aux rizières, comprises entre 26 et 28 °C (79 à 82 °F), où *B. splendens* vit dans la nature. Apparemment, ce sont ces mêmes températures que préfèrent les agents pathogènes opportunistes comme *M. marinum* (Kent *et al.* 2006; Mutoji et Ennis 2012; Gauthier 2015). Dans les ménages censés acheter les lignées déclarées, nous n'avons aucune connaissance de l'état de santé des personnes susceptibles d'être exposées, mais il est probable qu'il s'agisse de personnes immunodéprimées, d'enfants, de personnes souffrant de pathologies sous-jacentes ou d'autres personnes vulnérables. La prudence est de mise lors de la manipulation de poissons d'animalerie en raison, par exemple, du risque d'infection par des mycobactéries non tuberculeuses (Kušar *et al.* 2017). *M. marinum* est considéré comme l'agent pathogène le plus important pour les poissons, mais c'est aussi un pathogène opportuniste pour l'homme (Cassetty et Sanchez 2004; Kušar *et al.* 2017; Hashish *et al.* 2018). La présence de pathogènes bactériens zoonotiques *M. marinum* chez des combattants de Siam sains met en évidence le risque d'infection pour les humains, non seulement en cas d'exposition à des poissons infectés, mais aussi lors de la manipulation de poissons cliniquement asymptomatiques (Sirimalaisuwana *et al.* 2017). Outre *M. marinum*, l'exposition indirecte à des agents pathogènes par le biais de poissons d'aquarium tropicaux a

été soupçonnée comme étant la cause de la diarrhée associée à *Edwardsiella tarda* dans le cas d'un nourrisson belge de 2 mois, où le même organisme a été isolé à partir d'un poisson d'aquarium tropical au domicile du patient (Vandepitte *et al.* 1983).

DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT

Selon la société déclarante, les PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 ne sont pas destinés à être rejetés dans l'environnement. L'utilisation prévue est limitée aux aquariums dans les maisons et les points de vente au détail. Cependant, il est probable qu'une partie des poissons gardés dans les aquariums domestiques puisse être relâchée dans l'environnement (Duggan *et al.* 2006; Gertzen *et al.* 2008). Selon Gertzen *et al.* (2008), les aquariophiles pourraient potentiellement rejeter des poissons d'aquarium indésirés dans l'environnement lorsqu'ils s'en lassent ou lorsque les poissons deviennent agressifs, malades, de grande taille ou se reproduisent rapidement. S'il devait y avoir des rejets de poissons vivants dans l'environnement, le devenir des PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 au Canada serait largement fonction des conditions environnementales au point de rejet et de la capacité des poissons relâchés à survivre, croître, se reproduire, se disperser et établir des populations autonomes (Duggan *et al.* 2006; Strecker *et al.* 2011; Leggatt *et al.* 2018).

Parmi les facteurs environnementaux, la tolérance à la température est un critère essentiel pour déterminer la capacité des poissons d'aquarium à survivre, à s'établir et à passer l'hiver dans les Grands Lacs et dans l'ensemble des eaux canadiennes (Rixon *et al.* 2005; MPO 2018; Leggatt *et al.* 2018). La société déclarante a fourni des données de tolérance à la température issues de trois études démontrant une DL₅₀ de 7,44 °C pour PiBS2019, de 6,93 °C pour OBS2019 et de 7,49 °C pour GBS2019. Dans ces études, la DL₅₀ correspondante pour les comparateurs non transgéniques était de 7,2 °C comparativement à PiBS2019, de 6,83 °C comparativement à OBS2019 et de 7,15 °C comparativement à GBS2019. En général, les génotypes transgéniques (PiBS2019, OBS2019 et GBS2019) ont montré une plus grande sensibilité (non significative pour la comparaison OBS2019/non-transgénique) aux températures de l'eau froide par rapport à leurs homologues non transgéniques, mais toujours dans les plages de températures létales de l'eau pour *B. splendens*. Dans une étude récente non publiée de Leggatt (2021), on a constaté que *B. splendens* ne pouvait plus s'acclimater à une température moyenne de 10,0 ± 1,2 °C (plage de 16 à 7,9 °C). Même avec le *B. splendens* le plus tolérant au froid, le poisson ne pouvait plus s'acclimater plusieurs degrés au-dessus des températures de l'eau typiques de l'hiver au Canada (4 °C ou moins) et au-dessus des températures des lacs les plus chauds enregistrés (6 °C ou moins en hiver). En plus du faible potentiel de survie et d'établissement dans l'environnement canadien, on s'attend à ce que PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 aient des capacités de dispersion limitées dans l'environnement, principalement en raison de leur faible tolérance aux températures froides. En outre, si des PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 vivants ou morts sont relâchés dans l'environnement, les individus en question et les protéines fluorescentes insérées devraient se biodégrader normalement, ils ne devraient pas se bioaccumuler, et leur participation au cycle biogéochimique ne devrait pas différer de celle des autres organismes vivants. Par conséquent, la probabilité que PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 établissent des populations autonomes au Canada est très faible en raison de leur incapacité à survivre à des températures de l'eau inférieures à 8 °C. Par conséquent, la probabilité d'une exposition humaine aux organismes déclarés dans l'environnement est faible.

Bien que l'utilisation prévue ne soit pas l'introduction dans l'environnement en général, le potentiel de rejet dans l'environnement et, en fin de compte, d'une exposition humaine aux lignées déclarées peut être exacerbé par l'augmentation considérable des populations de PiBS2019, d'OBS2019 et de GBS2019 au Canada en raison de leur reproduction occasionnelle

dans les aquariums domestiques. Les facteurs importants sont la survie, la croissance et la reproduction, qui sont assurées et soutenues par les aquariophiles amateurs dans le cadre de l'utilisation prévue. Dans la nature, les combattants, surtout les mâles, sont considérés comme des poissons territoriaux où les mâles ont tendance à défendre agressivement un territoire et les femelles préfèrent se regrouper avec d'autres femelles, mais en conservant une tendance à s'isoler dans la période de 24 heures précédant l'accouplement (Castro *et al.* 2006, Dziejewczynski *et al.* 2017; Plegging et Moons 2017). Le succès de la reproduction dépendra de la taille du nid, car les nids plus gros peuvent accueillir plus d'œufs fécondés et favoriser une oxygénation efficace (Srikrishnan *et al.* 2017). *B. splendens* a une période de développement embryonnaire relativement courte, puisque les œufs éclosent environ 36 heures après la fécondation (Murcia-Ordoñez *et al.* 2016). Les vésicules vitellines sont totalement absorbées 73 heures après l'éclosion, la métamorphose étant complète 768 heures après l'éclosion lorsque les larves deviennent des juvéniles (Valentin *et al.* 2015).

Si un poisson meurt avant d'être vendu ou pendant qu'il est sous la garde d'un aquariophile amateur, la société déclarante suggère une procédure d'élimination similaire à celle des autres déchets domestiques et aucune procédure spéciale de manipulation ou d'élimination n'est requise. La société déclarante a indiqué qu'aucune procédure ou aucun traitement spécifique n'est nécessaire pour l'élimination des organismes déclarés (PiBS2019, OBS2019 et GBS2019) par rapport aux espèces de type sauvage, puisque la seule différence (pour chaque lignée) est l'ajout d'une protéine fluorescente dérivée d'une espèce de corail. En outre, la vente de ces lignées peut être interrompue à tout moment s'il est jugé nécessaire de mettre fin à l'introduction de PiBS2019, d'OBS2019 et de GBS2019 au Canada.

AUTRES UTILISATIONS POTENTIELLES

Les PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 ne sont conçus que pour servir de poissons d'ornement dans des aquariums domestiques d'intérieur. Selon la société déclarante, les trois lignées déclarées ne conviennent pas pour une utilisation dans des étangs extérieurs, comme poisson-appât, pour la consommation humaine ou comme sentinelle environnementale. Cependant, *B. splendens* a été étudié pour son utilisation potentielle comme bio-indicateur de la pollution des eaux douces. Alyan (2007) a examiné l'influence de deux polluants métalliques (chlorure mercurique et azoture de sodium) sur des comportements agressifs spécifiques des mâles. Un comportement moins agressif a été observé chez les mâles dans les conditions de traitement et l'auteur a conclu que le comportement agressif des mâles chez *B. splendens* pourrait potentiellement être utilisé comme bio-indicateur de polluants d'eau douce. De plus, on sait que *B. splendens* a une préférence pour les larves de moustiques (Monvises *et al.* 2009), et l'espèce a été étudiée pour une utilisation potentielle dans le contrôle des populations de moustiques (de Oliveira Lima *et al.* 2010; Miraldo et Pecora 2017; Mah *et al.* 2018). En tant qu'organisme de recherche, les combattants sont considérés comme un modèle vertébré passionnant dans des domaines tels que l'évolution et la phylogénétique, la morphologie fonctionnelle, la détermination du sexe, l'hybridation, la physiologie, la biologie du développement, la diversité des traits fonctionnels, la diversité biologique, le comportement agressif et la génétique des populations (Srikuhnath *et al.* 2021).

La fabrication des organismes déclarés ne devrait pas avoir lieu au Canada, car les lignées PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 ne sont produites qu'en Floride. Mais si elles devaient être produites au Canada, on ne prévoit aucun risque autre que celui auquel on s'attend d'autres poissons d'aquarium communs. La société déclarante recommande aux personnes qui ne souhaitent plus conserver les organismes après leur achat de les retourner au détaillant, de les donner à un autre aquariophile amateur ou de les euthanasier sans cruauté.

CARACTÉRISATION DE L'EXPOSITION

Les risques liés à une exposition à la souche déclarée en milieu de travail ne sont pas pris en compte dans la présente évaluation¹.

Le potentiel d'exposition humaine aux combattants PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 est jugé faible à moyen (tableau 3) pour les raisons suivantes :

1. Les principales sources d'exposition humaine proviendraient de l'importation proposée de poissons adultes pour les trois lignées (PiBS2019, OBS2019 et GBS2019) par des points d'entrée non déterminés au Canada.
2. L'intention est d'avoir des poissons adultes PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 disponibles pour l'achat par le public dans un maximum de 500 points de vente au détail partout au Canada où sont vendus des poissons tropicaux d'aquarium, et non pour l'introduction dans l'environnement canadien.
3. La seule utilisation prévue des PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 est leur utilisation comme poissons d'ornement d'aquarium, ce qui limite l'exposition potentielle du grand public principalement aux personnes qui possèdent un aquarium domestique. Ces ménages peuvent comprendre des personnes immunodéprimées, des enfants, des personnes souffrant de pathologies sous-jacentes ou d'autres personnes vulnérables. La densité de charge recommandée pour les lignées déclarées dans un aquarium domestique est d'un mâle et de jusqu'à quatre femelles par foyer.
4. L'exposition humaine propre à des poissons vivants ou morts dans un contexte domestique est le plus souvent liée aux activités d'entretien, comme le nettoyage de l'aquarium et les changements d'eau. L'exposition humaine par le biais de l'environnement à la suite de rejets accidentels ou délibérés dans l'environnement est peu probable en raison de la faible tolérance au froid, qui entraîne une survie, une reproduction et une dispersion limitées dans l'environnement.
5. Aucune augmentation significative de l'exposition humaine n'est attendue des autres utilisations potentielles des PiBS2019, OBS2019 et GBS2019, soit en tant que bio-indicateurs de la pollution environnementale, pour le contrôle des moustiques et à des fins de recherche.

¹ La détermination du respect ou du non-respect d'un ou de plusieurs des critères énoncés à l'article 64 de la LCPE s'appuie sur une évaluation des risques potentiels pour l'environnement ou la santé humaine associés à une exposition dans l'environnement général. Pour les êtres humains, cela comprend, sans toutefois s'y limiter, les expositions à partir de l'air, de l'eau et de l'utilisation de produits contenant les substances en question. Une conclusion établie en vertu de la LCPE ne peut pas dépendre d'une évaluation par rapport aux critères énoncés dans le *Règlement sur les produits dangereux*, qui fait partie du cadre réglementaire du Système d'information sur les matières dangereuses utilisées au travail (SIMDUT) pour les produits destinés à être utilisés dans le milieu de travail, mais ne peut toutefois pas l'exclure.

Tableau 3 : Considérations relatives à l'exposition (pour la santé humaine)

| Exposition | Facteurs à considérer |
|----------------|---|
| Élevée | <ul style="list-style-type: none"> • La quantité rejetée, la durée des rejets ou la fréquence des rejets sont élevées. • L'organisme est susceptible de survivre, de persister, de se disperser, de proliférer et de s'établir dans l'environnement. • La dispersion ou le transport de l'organisme vers d'autres compartiments environnementaux sont probables. • La nature du rejet rend vraisemblable le fait que des populations ou des écosystèmes vulnérables seront exposés ou que les rejets s'étendront au-delà d'une région ou d'un seul écosystème. • En ce qui concerne les humains exposés, les voies d'exposition permettraient la présence d'effets toxiques, d'effets zoonotiques ou d'autres effets nocifs chez les organismes vulnérables. |
| Moyenne | <ul style="list-style-type: none"> • L'organisme est rejeté dans l'environnement, mais la quantité rejetée, la durée du rejet ou la fréquence du rejet sont modérées. • L'organisme peut persister dans l'environnement, mais en petits nombres. • Le potentiel de dispersion ou de transport de l'organisme est limité. • Du fait de la nature du rejet, certaines populations vulnérables peuvent y être exposées. • Chez l'humain exposé, les voies d'exposition ne devraient pas favoriser la présence d'effets toxiques, d'effets zoonotiques ou d'autres effets nocifs. |
| Faible | <ul style="list-style-type: none"> • L'organisme est utilisé en milieu confiné (aucun rejet intentionnel). • La nature du rejet et/ou la biologie de l'organisme devrait permettre de contenir l'organisme de sorte que les populations ou les écosystèmes vulnérables ne seront pas exposés. • Les organismes sont rejetés en faibles quantités, les rejets sont de courte durée et peu fréquents, et les organismes ne devraient pas survivre, persister, se disperser ou proliférer dans l'environnement dans lequel ils sont rejetés. |

INCERTITUDE LIÉE À L'ÉVALUATION DE L'EXPOSITION À DES RISQUES INDIRECTS POUR LA SANTÉ HUMAINE

Le classement des incertitudes associées aux informations utilisées pour évaluer l'exposition indirecte à la santé humaine pour PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 est présenté dans le tableau 4. Cette évaluation de l'exposition est fondée sur les renseignements fournis par la société déclarante à propos des sources d'exposition et des facteurs ayant une incidence sur l'exposition humaine, notamment de l'importation, de la vente au détail et de la survie des organismes dans l'environnement. Comme il est indiqué, les organismes déclarés ne seront pas produits au Canada et la source d'exposition sera limitée à l'importation de poissons adultes des trois lignées. Dans l'environnement, les données empiriques permettent de conclure que la survie de ces poissons devrait être limitée en raison de leur faible tolérance aux températures inférieures à 10 °C. Toutefois, cela n'exclut pas la possibilité d'une exposition humaine (grand public et personnes vulnérables [c.-à-d., personnes immunodéprimées, enfants, personnes souffrant de problèmes de santé, etc.]) au Canada par le biais des aquariums domestiques, principalement lors des activités d'entretien et de nettoyage. Cette évaluation de l'exposition est également limitée par le manque de renseignements sur le nombre réel d'organismes déclarés qui seront importés durant les années suivantes, ce qui rend difficile l'évaluation de l'intérêt du public et de la popularité des poissons au-delà de la première année d'importation. De plus, les

enquêtes sur les ménages portant sur la possession de poissons d'aquarium au Canada sont basées sur des rapports datant de plus de 10 ans (Duggan *et al.* 2006; Gertzen *et al.* 2008; Perrin 2009; Marson *et al.* 2009). Ces rapports ne sont pas spécifiques aux lignées PiBS2019, OBS2019 ou GBS2019 et ne portent pas sur l'étude des facteurs influençant l'exposition humaine aux poissons d'aquarium. Par conséquent, en raison de l'information limitée sur les scénarios d'exposition précis dans le marché canadien, l'exposition humaine aux organismes déclarés est considérée entre faible et moyenne avec une incertitude modérée.

Tableau 4 : Classement de l'incertitude associée aux risques indirects de l'exposition pour la santé humaine.

| Renseignements disponibles | Classement du niveau d'incertitude |
|---|------------------------------------|
| Données de grande qualité sur l'organisme, les sources d'exposition humaine et les facteurs ayant une incidence sur l'exposition humaine à l'organisme. Signes d'une faible variabilité. | Négligeable |
| Données de grande qualité sur des organismes proches ou des substituts valides, les sources d'exposition humaine et les facteurs ayant une incidence sur l'exposition humaine à l'organisme ou à des substituts valides. Signes de variabilité. | Faible |
| Données limitées sur l'organisme, des organismes proches ou des substituts valides, les sources d'exposition humaine et les facteurs ayant une incidence sur l'exposition humaine à l'organisme. | Modérée |
| Importantes lacunes dans les connaissances. Dépendance importante à l'égard de l'opinion d'experts. | Élevée |

CARACTÉRISATION DES RISQUES

UTILISATION DÉCLARÉE

Dans cette évaluation, le risque est caractérisé selon un paradigme : Risque \propto Danger x Exposition. Les deux composantes (« danger » et « exposition ») sont considérées comme faisant partie intégrante de la définition de « toxique » au sens de l'article 64 de la LCPE 1999 et, par conséquent, il n'y a pas de risque en l'absence de l'une ou l'autre. La conclusion de l'évaluation du risque s'appuie sur le danger, et sur ce que nous pouvons prévoir à propos de l'exposition à partir de l'utilisation déclarée.

Les lignées PiBS2019, OBS2019 ou GBS2019 sont des lignées génétiquement modifiées de combattants diploïdes, hémizygotes ou homozygotes, contenant des constructions génétiques de protéines fluorescentes dérivées d'espèces d'anémones de mer ou de coraux mous qui leur donnent une coloration rose (PiBS2019), orange (OBS2019) ou verte (GBS2019) sous la lumière ambiante, y compris à la lumière du soleil. Les trois lignées sont issues d'une lignée de combattants de couleur claire, une variante pigmentaire créée lors de la domestication de l'espèce.

Les organismes déclarés seront commercialisés dans l'ensemble du Canada pour un usage en tant que poissons d'ornement dans les aquariums domestiques.

Bien qu'il existe des cas rapportés d'infections zoonotiques attribuables à une exposition à des poissons d'aquarium, les combattants de type sauvage sont populaires dans les aquariums domestiques et ont un long historique d'utilisation sûre, puisqu'ils sont vendus comme poissons d'aquarium depuis les années 1930 (Innes 1935; Wallbrunn 1958). Les trois lignées déclarées (PiBS2019, OBS2019 et GBS2019) ont fait l'objet en 2019 et en 2020 d'une décision de la Food and Drug Administration des États-Unis (USFDA) relativement au pouvoir discrétionnaire d'application, et GBS2019 est disponible dans le commerce aux États-Unis depuis le début de 2020. Les protéines fluorescentes utilisées pour GBS2019, OBS2019 et PiBS2019 ont été utilisées dans d'autres lignées GloFish^{MD} approuvées au Canada. Bien qu'un cas d'infection associé aux combattants de type sauvage n'ait été signalé, les gènes de protéine fluorescente insérés et les méthodes utilisées pour modifier PiBS2019, OBS2019 et GBS2019 permettent de conclure que les lignées déclarées ne présentent pas un potentiel pathogène ou toxique pour l'homme supérieur à celui du *B. splendens* de type sauvage.

Au vu du potentiel de danger faible et du potentiel d'exposition faible à modéré, les risques pour la santé humaine liés à l'utilisation des *B. splendens* PiBS2019, OBS2019 ou GBS2019 en tant que poisson d'ornement dans des aquariums sont considérés comme faibles.

AUTRES UTILISATIONS POTENTIELLES

D'autres utilisations ont été répertoriées, notamment l'utilisation des organismes déclarés comme bio-indicateurs de la pollution environnementale, pour la lutte contre les moustiques, et à des fins de recherche. Peu importe l'utilisation, les renseignements disponibles n'indiquent pas de répercussions possibles sur la santé humaine. Aucun risque pour la santé humaine autre que ceux des *B. splendens* de type sauvage et autres poissons d'aquarium habituels n'est à prévoir.

CONCLUSION CONCERNANT L'ÉVALUATION DES RISQUES

Aucune preuve ne semble indiquer qu'il existe un risque d'effets nocifs sur la santé humaine aux degrés d'exposition prévus pour la population canadienne découlant de l'utilisation de PiBS2019, OBS2019 ou GBS2019 comme poissons d'ornement d'aquarium ou de toute autre utilisation possible. Selon toute vraisemblance, le risque pour la santé humaine associé à l'utilisation de PiBS2019, OBS2019 ou GBS2019 ne répond pas aux critères énoncés à l'alinéa 64c) de la LCPE (1999). Aucune autre mesure n'est recommandée.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Alyan, S. 2007. Aggressive behaviour in *Betta splendens* as a bio-indicator of freshwater pollution. *Fresenius Environmental Bulletin*. 16(2):176-181.
- Baiano, J.C.F., and Barnes, A.C. 2009. Towards control of *Streptococcus iniae*. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1891-1896.
- Boylan, S. 2011. Zoonoses associated with fish. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 14:427-438.
- Cameselle-Martínez, D., Hernández, J., Francès, A., Montenegro, T., Canas, F., and Borrego, L. 2007. Sporotrichoid cutaneous infection by *Mycobacterium haemophilum* in an AIDS patient. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 98(3):188-193.
- Cardoso, P.H.M., Moreno, A.M., Moreno, L.Z., de Oliveira, C.H., de Assis Baroni, F., de Lucca Maganha, S.R., de Sousa, R.L.M., and de Carvalho Balian, S. 2019. Infectious diseases in aquarium ornamental pet fish: Prevention and control measures. *Braz. J. Res. Anim. Sci.* 56(2):e151697.

-
- Cassetty, C.T., and Sanchez, M. 2004. *Mycobacterium marinum* infection. *Dermatology Online Journal*. 10(3):21.
- Castro, N., Ros, A.F.H., Becker, K., and Oliveira, R.F. 2006. Metabolic costs of aggressive behaviour in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aggressive Behaviour*. 32(5):474-480.
- CDC. 2015. [Healthy pets, healthy people](#). Centers for Disease Control and Prevention. Accessed March 24, 2021.
- Chailertit, V., Swatdipong, A., Peyachoknagul, S., Salaenoi, J., and Srikulnah, K. 2014. Isolation and characterization of novel microsatellite markers from Siamese fighting fish (*Betta splendens*, Osphronemidae, Anabantoidae) and their transferability to related species, *B. smaragdina* and *B. imbellis*. *Genet. Molec. Res.* 13(3):7157-7162.
- Cremonesini, D., and Thomson, A. 2008. Lung colonization with *Aeromonas hydrophila* in cystic fibrosis believed to have come from a tropical fish tank. *J. R. Soc. Med.* 101:S44-S45.
- de Oliveira Lima, J.W., de Góes Cavalcanti, L.P., Pontes, R.J.S., and Heukelbach, J. 2010. Survival of *Betta splendens* fish (Regan, 1910) in domestic water containers and its effectiveness in controlling *Aedes aegypti* larvae (Linnaeus, 1762) in Northeast Brazil. *Trop. Med. Internat. Health*. 15(12):1525-1532.
- Delghandi, M.R., El-Matbouli, M., and Menanteau-Ledouble, S. 2020. Mycobacteriosis and infections with non-tuberculous mycobacteria in aquatic organisms: A review. *Microorganisms*. 8(9):1368:1-18.
- Dinç, G., Doğanay, M., and Izgür, M. 2015. Important bacterial infections transmitted to humans from pet animals. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 72(2):163-174.
- Duggan, I. C., Rixon, C. A., and MacIsaac, H. J. 2006. Popularity and propagule pressure: determinants of introduction and establishment of aquarium fish. *Biological Invasions* 8(2):377-382.
- Dunn, J.R., Behravesh, C.B., and Angulo, F.J. 2015. Diseases transmitted by domestic livestock: Perils of the petting zoo. *Microbiol. Spectrum* 3(6):IOL5-0017-2015.
- Dzieweczynski, T.L., Greaney, N.E., Portrais, K.B., and Stevens, M.A. 2017. I remember you: Female Siamese fighting fish recognise prior social partners. *Behaviour*. 154:19-35.
- Emmerich, K., Kolb-Mäurer, A., and Goebeler, M. 2019. Cutaneous infections due to non-tuberculous mycobacteria. *Aktuelle Dermatologie* 45(1-2):47-51.
- Florindo, M.C., Jerônimo, G.T., Steckert, L.D., Acchile, M., Gonçalves, E.L.T., Cardoso, L., and Martins, M.L. 2017a. Protozoan parasites of freshwater ornamental fish. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 45(5):948-956.
- Florindo, M.C., Jerônimo, G.T., Steckert, L.D., Acchile, M., Figueredo, A.B., Gonçalves, E.L.T., Cardoso, L., da Costa Marchiori, N., da Costa Assis, G., and Martins, M.L. 2017b. Metazoan parasites of freshwater ornamental fish. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 45(5):992-998.
- Franco-Paredes, C., Chastain, D.B., Allen, L., and Henao-Martínez, A.F. 2018. Overview of cutaneous mycobacterial infections. *Curr. Trop. Med. Rep.* 5(4):228-232.
- Franco-Paredes, C., Marcos, L.A., Henao-Martínez, A.F., Rodríguez-Morales, A.J., Villamil-Gómez, W.E., Gotuzzo, E., and Bonifaz, A. 2019. Cutaneous mycobacterial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 32(1):e00069-18.

-
- Gaulin, C., Vincent, C., and Ismail, J. 2005. Sporadic infections of *Salmonella* paratyphi B, var. Java associated with fish tanks. *Can. J. Public Health* 96(6):471-474.
- Gauthier, D.T. 2015. Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *Vet. J.* 203:27-35.
- Gertzen, E., Familiar, O., and Leung, B. 2008. Quantifying invasion pathways: fish introductions from the aquarium trade. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 65(7):1265-1273.
- Haenen, O.L.M., Evans, J.J., and Berthe, F. 2013. Bacterial infections from aquatic species: Potential for and prevention of contact zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 32:497-507.
- Haenen, O., Karunasagar, I., Manfrin, A., Zrnčić, S., Lavilla-Pitogo, C., Lawrence, M., Hanson, L., Subasinghe, R., Bondad-Reantaso, M.G., and Karunasagar, I. 2020. Contact-zoonotic bacteria of warmwater ornamental and cultured fish. *Asian Fisheries Science*. 33.S1:39-45.
- Hashish, E., Merwad, A., Elgaml, S., Amer, A., Kamal, H., Elsadek, A., Marei, A. and Sitohy, M. 2018. *Mycobacterium marinum* infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review. *Veterinary Quarterly*. 38(1):35-46.
- Hossain, S., De Silva, B.C.J., Dahanayake, P.S., and Heo G.-J. 2018. Characterization of virulence properties and multi-drug resistance profiles in motile *Aeromonas* spp. isolated from zebrafish (*Danio rerio*). *Lett. Appl. Microbiol.* 67:598-605.
- Innes, W.T. 1950. *Exotic Aquarium Fishes: A work of general reference*. Philadelphia: Innes Publishing Company.
- Iqbal, Z., Ansar, F., and e-Huma, Z. 2018. Risk of importing zoonotic diseases through infected ornamental fish. *Punjab University Journal of Zoology*. 33(2):211-215.
- Jaroensutasinee, M., and Jaroensutasinee, K. 2001. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. *J. Fish Bio.* 58:1311-1319.
- Kamijo, F., Uhara, H., Kubo, H., Nakanaga, K., Hoshino, Y., Ishii, N., and Okuyama, R. 2012. A case of mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a review of cutaneous infection. *Case Rep. Dermatol.* 4(1):76-79.
- Kanchan, C., Imjai, P., Kanchan, N., Panchai, K., and Hatai, K. 2019. Virulence of *Aeromonas hydrophila* in Siamese fighting fish (*Betta splendens*) and the bacterium susceptibility to some herbal plants. *Iran. J. Fish. Sci.* 18(2):349-354.
- Kent, M. L., Watral, V., Wu, M., and Bermudez, L. E. 2006. *In vivo* and *in vitro* growth of *Mycobacterium marinum* at homoeothermic temperatures. *FEMS microbiology letters* 257(1):69-75.
- Kowasupat, C., Panijpan, B., Ruenwongsa P., and Sriwattanarothai, N. 2012. *Betta mahachaiensis*, a new species of bubble-nesting fighting fish (Teleostei: Osphronemidae) from Samut Sakhon Province, Thailand. *Zootaxa*. 3522:49-60.
- Kušar, D., Zajc, U., Jenčič, V., Ocepek, M., Higgins, J., Žolnir-Dovč, M., and Pate, M. 2017. Mycobacteria in aquarium fish: results of a 3-year survey indicate caution required in handling pet-shop fish. *J. Fish Dis.* 40(6):773-784.
- Lazado, C.C., and Zilberg, D. 2018. Pathogenic characteristics of *Aeromonas veronii* isolated from the liver of a diseased guppy (*Poecilia reticulata*). *Lett. Appl. Microbiol.* 67:476-483.

-
- Leggatt, R.A., Dhillon, R.S., Mimeault, C., Johnson, N., Richards, J.G., and Devlin, R.H. 2018. Low-temperature tolerances of tropical fish with potential transgenic applications in relation to winter water temperatures in Canada. *Can. J. Zool.* 96(3):253-260.
- Leggatt, R. 2021. Report on the lower chronic temperature limits of *Betta splendens* in relation to winter freshwater temperatures in Canada. Unpublished.
- Li, J., Chong, A.H., O'Keefe, R., and Johnson, P.D.R. 2014. The fish tank strikes again: Metachronous nontuberculous mycobacterial skin infection in an immunosuppressed host. *Austral. J. Dermatol.* 55:e77-e79.
- Lowry, T., and Smith, S.A. 2007. Aquatic zoonoses associated with food, bait, ornamental, and tropical fish. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231:876-880.
- Mah, H.F., Nizam, S., and Ismail, S. 2018. Prospect and efficiency of exotic fish as mosquito larvae biological control agent. *Internat. J. Med. Toxicol. Leg. Med.* 21(3-4):145-149.
- Marson, D., Cudmore, B., Drake, D.A.R., and Mandrak, N.E. 2009. Summary of a survey of aquarium owners in Canada. *Can. Manuscr. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2905: iv + 20 p.
- Miraldo, M.C., and Pecora, I.L. 2017. Efficiency of Brazilian native ornamental fishes as mosquito larvae predators. *Boletim do Instituto de Pesca.* 43:93-98.
- Monvises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanothai, N., and Panjipan, B. 2009. The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. *ScienceAsia.* 35:8-16.
- MPO. 2018. Évaluation des risques pour l'environnement et des risques indirects pour la santé humaine du tétra GlofishMD Electric GreenMD et du tétra à longues nageoires GlofishMD Electric GreenMD (*Gymnocorymbus ternetzi*) : un poisson d'ornement transgénique. *Secr. can. de consult. sci. du MPO. Avis sci.* 2018/027.
- Murcia-Ordoñez, B., Chaves, L.C., España, W.F., Castañeda, D., and Andrade, J. 2016. Reproductive physiology *Betta splendens* fish in laboratory conditions, Piedemonte Andino Amazon (Colombia). *Revista Veterinaria.* 27(2):124-129.
- Musto, J., Kirk, M., Lightfoot, D., Combs, B.G., and Mwanri, L. 2006. Multi-drug resistant *Salmonella* Java infections acquired from tropical fish aquariums, Australia, 2003-04. *CDI* 30:222-227.
- Mutoji, K.N., and Ennis, D.G. 2012. Expression of common fluorescent reporters may modulate virulence for *Mycobacterium marinum*: dramatic attenuation results from GFP over-expression. *Comp. Biochem. Physiol. C* 155:39-48.
- Panjipan, B., Kowasupat, C., Laosinchai, P., Ruenwongsa, P., Phondgara, A., Senapin, S., Wanna, W., Phiwsaiya, K., Kühne, J., and Fasquel, F. 2014. Southeast Asian mouth-brooding *Betta* fighting fish (Teleostei: Perciformes) species and their phylogenetic relationships based on mitochondrial COI and nuclear ITS1 DNA sequences and analyses. *Meta Gene* 2:862-879.
- Pate, M., Ovca, A., Jenčič, V., Žolnir-Dovč, M., and Ocepek, M. 2019. Mycobacteria in aquarium fish: Are fish handlers aware of their zoonotic potential. *Slov. Vet. Res.* 56(2):53-58.
- Perrin, T. 2009. The business of urban animals survey: the facts and statistics on companion animals in Canada. *The Canadian Veterinary Journal* 50(1):48.
- Pleeging, C.C.F., and Moons, C.P.H. 2017. Potential welfare issues of the Siamese fighting fish (*Betta splendens*) at the retailer and in the hobbyist aquarium. *Vlaams Dierrgeneeskundig Tijdschrift.* 86(4):213-223.
-

-
- Puk, K., and Guz, L. 2020. Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish. *Ann. Agric. Environ. Med.* 27(4):535-539.
- Rainwater, F.L. 1967. Courtship and reproductive behavior of the Siamese fighting fish, *Betta splendens* Regan (Pisces, Belontiidae). Master of Science Thesis, Oklahoma State University.
- Řehulka, J., Kaustova, J., and Řehulkova, E. 2006. Causal agents of mycobacterial diseases in freshwater ornamental fish and their importance for human health in the Czech Republic. *Acta Vet. BRNO.* 75:251-258.
- Richards, H.A., Han, C-T., Hopkins, R.G., Failla, M.L., Ward, W.W., and Stewart, C.N. Jr. 2003. Safety assessment of recombinant green fluorescent protein orally administered to weaned rats. *J. Nutr.* 133(6):1909-1912.
- Rixon, C.A., Duggan, I.C., Bergeron, N.M., Ricciardi, A., and MacIsaac, H.J. 2005. Invasion risks posed by the aquarium trade and live fish markets on the Laurentian Great Lakes. *Biodiv. Conserv.* 14:1365-1381.
- Roberts, H.E., Palmeiro, B., and Weber, E.S. 2009. Bacterial and parasitic diseases of pet fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 12(3):609-638.
- Sirimalaisuwan, A., Teeraruk, P., Kanjanapitakchai, P., Kaewsakhorn, T., Potibut, P., and Pikulkaew, S. (2017). Detection of *Mycobacterium marinum* in clinically asymptomatic Siamese fighting fish (*Betta splendens*) from ornamental fish shops in Chiang Mai Province, Thailand. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 7, 344-346.
- Srikrishnan, R., Hirimuthugoda, N., and Rajapakshe, W. 2017. Evaluation of growth performance and breeding habits of fighting fish (*Betta splendens*) under 3 diets and shelters. *J. Survey Fish. Sci.* 3(2):50-65.
- Srikulnath, K., Singchat, W., Laopichienpong, N., Ahmad, S.F., Jehangir, M., Subpayakom, N., Suntronpong, A., Jangtarwan, K., Pongsanarm, T., Panthum, T., Ariyaphong, N., Camcuan, J., Duengkae, P., Dokkaew, S., and Muangmai, N. 2021. Overview of the betta fish genome regarding species radiation, parental care, behavioral aggression, and pigmentation model relevant to humans. *Genes & Genomics.* 43:91-104.
- Statistics Canada. 2017. [Canada \[Country\] and Canada \[Country\] \(table\). Census Profile. 2016 Census](#). Statistics Canada Catalogue no. 98-316-X2016001. Ottawa. Released November 29, 2017. (accessed March 4, 2021).
- Strecker, A. L., Campbell, P. M., and Olden, J. D. 2011. The aquarium trade as an invasion pathway in the Pacific Northwest. *Fisheries*, 36(2):74-85.
- Trujillo-González-A., Becker, J.A., and Hutson, K.S. 2018. Parasite dispersal from the ornamental goldfish trade. *Adv. Parasit.* 100:239-281.
- U.S. Fish and Wildlife Service. 2019. [Siamese fighting fish \(*Betta splendens*\): Ecological risk screening summary](#).
- Vandepitte, J., Lemmens, P., and De Swert, L. 1983. Human Edwardsiellosis traced to ornamental fish. *J. Clin. Microbiol.* 17(1):165-167.
- Valentin, F.N., do Nascimento, N.F., da Silva, R.C., Fernandes, J.B.K., Giannecchini, L.G., and Nakaghi, L.S.O. 2015. Early development of *Betta splendens* under stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Zygote.* 23(2):247-256.
- Wallbrunn, H.M. 1958. Genetics of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Genetics.* 43(3):289-298.
-

-
- Weir, M., Rajić, A., Dutil, L., Cernicchario, N., Uhland, F.C., Mercier, B., and Tuševljak, N. 2012. Zoonotic bacteria, antimicrobial use and antimicrobial resistance in ornamental fish: A systematic review of the existing research and survey of aquaculture-allied professionals. *Epidemiol. Infect.* 140:192-206.
- Whitfield, Y., and Smith, A. 2014. Household pets and zoonoses. *Environ. Health Rev.* 57(2):41-49.
- WHO/FAO. 2009. [Foods derived from modern biotechnology, 2nd edition](#). Rome, Italy: World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations (WHO/FAO), Codex Alimentarius.