

Microscopic detection of bacillus Calmette–Guérin mycobacteria in bladder biopsy using fluorescence *in situ* hybridization

Détection microscopique des Bacilles biliés de Calmette et Guérin (BCG) dans une biopsie vésicale par hybridation *in situ* en fluorescence

A. Loukil¹, S. A. Baron¹, X. Argemi², T. Maubon³ and C. Eldin¹

1) Aix-Marseille Université, IRD, MEPHI, IHU Méditerranée-Infection, Marseille, 2) GIE Almayviva Santé, Clinique Axiom, Aix en Provence and 3) Hôpital Privé Résidence Du Parc, Marseille, France

Abstract

Intravesical instillation of Bacilli Calmette Guérin (BCG) as a superficial bladder cancer treatment is generally well tolerated, but local or systemic complications may occur, some of which may be life-threatening. Following the suspicion of post-BCG cystitis in a 72-year-old man with a history of urothelial carcinoma treated by intravesical BCG instillation, we used fluorescence *in situ* hybridization (FISH) targeting the *rpoB* gene of the *Mycobacterium tuberculosis* complex to detect *Mycobacterium bovis* BCG in paraffin-embedded bladder biopsy sections. FISH yielded specific detection of BCG mycobacteria in the bladder biopsy section, appearing as red-fluorescent bacilli. Treatment with rifampicin, ethambutol and isoniazid is then initiated in combination with corticosteroid therapy.

© 2020 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Bladder cancer, fluorescence in situ hybridization, microscopic examination, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* complex

Mot clés: Cancer de la vessie, FISH, Examen microscopique, *Mycobacterium bovis* BCG, Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Original Submission: 7 September 2020; **Revised Submission:** 12 November 2020; **Accepted:** 22 November 2020

Article published online: 26 November 2020

Corresponding author: A. Loukil, Aix-Marseille Université, IRD, MEPHI, IHU Méditerranée-Infection, 19–21 Boulevard Jean Moulin, 13005, Marseille, France.

E-mail: loukilahmed@hotmail.com

Intravesical instillation of bacillus Calmette–Guérin (BCG) is part of superficial bladder cancer treatment promoting an effective inflammatory response against tumour cells [1]. A dose of approximately 10^{10} *Mycobacterium bovis* BCG over 6 weeks is instilled according to current treatment protocols [2]. This treatment is generally well tolerated, but local complications (granulomatous inflammation) or systemic complications (ranging from malaise and fever to sepsis) may occur in less than 5% of cases, some of which may be life-threatening [2–4].

Here we report the case of a 72-year-old man with a history of urothelial carcinoma diagnosed in January 2016 and treated by intravesical BCG instillation (BCGMEDAC, RIVM 1173-P2 strain; MEDAC, Lyon, France) in March 2016. In July 2016, routine follow-up cystoscopy revealed localized inflammatory lesions in the bladder fundus and left side wall, while endoscopic resection showed a giganto-cellular granuloma considered to be related to the BCG therapy. In early 2019, the patient was hospitalized for urinary disorders including enuresis, haematuria and overactive bladder. Examination of a bladder biopsy showed the persistence of an epithelioid and giganto-cellular granuloma. In July 2019, a thoraco-abdomino-pelvic computed tomography scan did not show any abnormalities with an infectious appearance. Following the suspicion of post-BCG cystitis, empirical treatment with ciprofloxacin for 3 weeks was initiated, but did not result in improvement of clinical symptoms. Molecular examination of urine samples by real-time PCR (Xpert MTB/RIF; Cepheid, Sunnyvale,

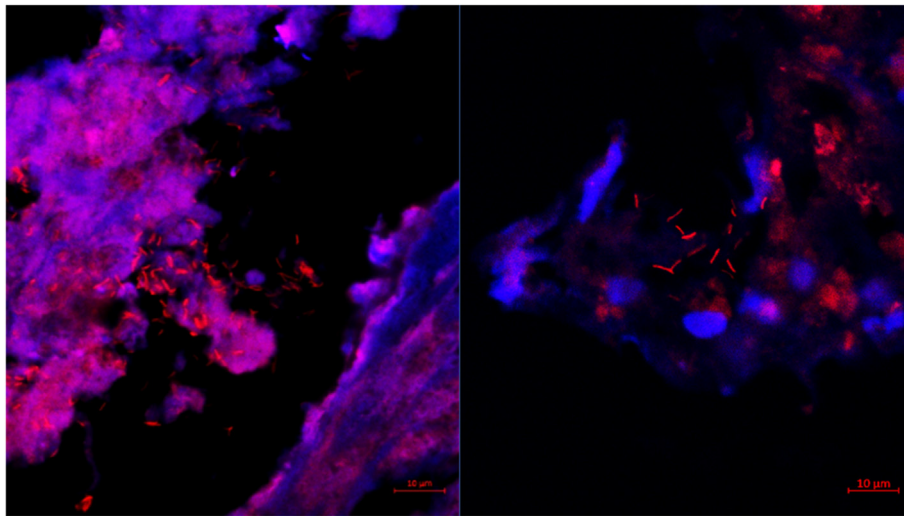


FIG. 1. Confocal microscopic images of bladder biopsy combining fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with L-4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Bacillus Calmette–Guérin mycobacteria were visualized as red fluorescent bacilli. Tissue sections were observed using a 63 × / 1.4NA oil-immersion objective of a Zeiss LSM800 confocal microscope driven by ZEN software (Zeiss). The 405-nm and 568-nm excitation lasers were used for DAPI and FISH probe signals, respectively. Scale bar = 10 μm.

CA, USA) revealed the presence of DNA from rifampicin-sensitive *Mycobacterium tuberculosis* complex mycobacteria. However, culture on COSMO medium (Eurobio, Les Ulis, France) remained negative after a 30-day incubation period. Paraffin-embedded bladder biopsy sections were examined by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) specifically targeting the *rpoB* gene of the *M. tuberculosis* complex to detect *M. bovis* BCG. After deparaffinization, tissue sections were treated with Sudan black (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fancy, France) to reduce the auto-fluorescent background [5] and the FISH protocol was performed using an oligonucleotide probe specific to the *M. tuberculosis* complex, as previously described [6]. Microscopic observation and image acquisition were performed using the 63 × objective of the Zeiss LSM 800 confocal microscope, driven by ZEN software (Zeiss, Marly-le-Roi, France). BCG mycobacteria were detected in the bladder biopsy section, appearing as red fluorescent bacilli, and the cell nuclei were visualized using L-4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue-fluorescent signal) (Fig. 1). Treatment with rifampicin, ethambutol and isoniazid was then initiated in combination with corticosteroid therapy.

Post-BCG bladder infections are often difficult to diagnose, which underestimates their prevalence. Indeed, the diagnostic performance of standard microscopic examination is low, in the order of 25.3% [7] and the urine culture is sometimes sterile [2]. The FISH technique represents an additional diagnostic tool for the microbiological investigation of bladder biopsy in individuals with a suspicion of localized or disseminated BCGitis following BCG therapy. These results confirm our previous observations [2] demonstrating the usefulness of FISH in some diagnoses such as BCG-infected aortic aneurysm [2].

Conflict of interest

All authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the French Government under the *Investissements d'Avenir* (Investments for the Future) programme managed by the *Agence Nationale de la Recherche* (French National Research Agency (ANR) (ref. Méditerranée Infection 10-IAHU-03). This work was supported by the Région Le Sud (Provence Alpes Côte d'Azur) and European funding (FEDER PA 0000320 PRIMMI).

References

- [1] Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström P-U, Choi W, et al. Bladder cancer. *Lancet* 2016;388:2796–810.
- [2] Darriet F, Bernioles P, Loukil A, Saidani N, Eldin C, Drancourt M. Fluorescence *in situ* hybridization microscopic detection of Bacilli Calmette Guérin mycobacteria in aortic lesions: a case report. *Medicine (Balt)* 2018;97:e11321.
- [3] Lamm DL, Van Der Meijden APM, Morales A, Brosnan SA, Catalona WJ, Herr HW, et al. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette–Guérin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J Urol* 1992;147:596–600.
- [4] Pommier JD, Ben Lasfar N, Van Grunderbeeck N, Burdet C, Laouénan C, Rioux C, et al. Complications following intravesical bacillus Calmette–Guérin treatment for bladder cancer: a case series of 22 patients. *Infect Dis* 2015;47:725–31.
- [5] Oliveira VC, Carrara RCV, Simoes DLC, Saggiaro FP, Carlotti CG, Covas DT, et al. Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and

improves resolution of *in situ* hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol Histopathol* 2010;25:1017–24.

[6] Loukil A, Kirtania P, Bedotto M, Drancourt M. FISHing *Mycobacterium tuberculosis* complex by use of a *rpoB* DNA probe bait. *J Clin Microbiol* 2018;56.

[7] Pérez-Jacoiste Asín MA, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Lumbreras C, Tejido Á, San Juan R, et al. *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG) infection following intravesical BCG administration as adjunctive therapy for bladder cancer: incidence, risk factors, and outcome in a single-institution series and review of the literature. *Medicine (Balt)* 2014;93:236–54.

L'instillation intravésicale des Bacilles de Calmette et Guérin (BCG) fait partie du traitement du cancer superficiel de la vessie favorisant une réponse inflammatoire efficace contre les cellules tumorales. [1]. Une dose d'environ 10^{10} *Mycobacterium bovis* BCG sur 6 semaines est instillée conformément aux protocoles thérapeutiques actuels [2]. Ce traitement est généralement bien toléré, mais des complications locales (inflammations granulomateuses) ou systémiques (variant d'un léger malaise et fièvre à une septicémie) peuvent survenir dans moins de 5% des cas dont certaines peuvent mettre en jeu le pronostic vital [2–4].

Nous rapportons ici le cas d'un homme âgé de 72 ans aux antécédents de carcinome urothélial diagnostiqué en janvier 2016 et traité par instillation intravésicale de BCG (BCGMEDAC, souche RIVM I 173-P2, MEDAC, Lyon, France) en Mars 2016. En juillet 2016, une cystoscopie de contrôle systématique révèle des lésions inflammatoires localisées dans le fond de la vessie et de la paroi latérale gauche, tandis que la résection endoscopique montre un granulome giganto-cellulaire considéré comme en rapport avec la BCG thérapie. Début 2019, le patient est hospitalisé pour des troubles de la miction à type d'énurésie, hématurie et hyperactivité vésicale. L'examen d'une biopsie vésicale montre la persistance d'un granulome épithélioïde et giganto-cellulaire. En juillet 2019, un scanner thoraco-abdomino-pelvien ne montre aucune anomalie d'allure infectieuse. Devant la suspicion de cystite post-BCG, un traitement empirique par ciprofloxacine pendant 3 semaines est initié, qui ne donnera pas d'amélioration des symptômes cliniques. L'examen moléculaire d'échantillons d'urine par PCR en temps réel (Xpert MTB/RIF, Cepheid, Sunnyvale, USA) révèle la présence d'ADN de mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* sensibles à la rifampicine. La culture sur milieu COSMO (Eurobio, Les Ulis, France) restera cependant négative à 30 jours. Des sections de biopsie vésicale incluses en paraffine sont examinées par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ciblant spécifiquement le gène *rpoB* du complexe *M. tuberculosis* afin de détecter *M. bovis* BCG. Après déparaffinage, les coupes tissulaires sont traitées avec du noir Soudan (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fancy, France) pour réduire le bruit de fond autofluorescent [5] et le protocole FISH est réalisé en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique du complexe *M. tuberculosis*, comme indiqué précédemment [6]. L'observation microscopique et l'acquisition d'images sont réalisées à l'aide de l'objectif 63x du microscope confocal Zeiss LSM 800, commandé par le logiciel Zen (Zeiss, Marly-le-Roi, France). Des mycobactéries BCG sont identifiées dans la section de biopsie vésicale, apparaissant comme des bacilles fluorescents en rouge, tandis que les noyaux cellulaires sont visualisés par L 4', 6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (signal fluorescent bleu) (Fig.). Un traitement par rifampicine, éthambutol et isoniazide est alors instauré en association à une corticothérapie.

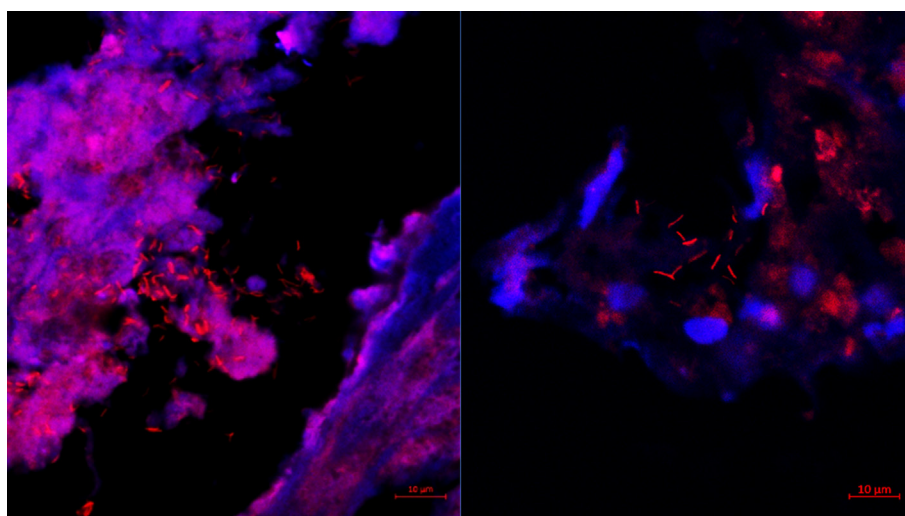


FIG. Images microscopiques confocales de la biopsie vésicale combinant les marquages FISH et DAPI. Les mycobactéries de BCG sont visualisées comme des bacilles fluorescents en rouge. Les sections tissulaires ont été observées à l'aide d'un objectif à immersion 63X/1.4NA du microscope confocal Zeiss LSM800 piloté par le logiciel Zen (Zeiss). Les lasers d'excitation 405 et 568 nm ont été utilisés pour les marquages DAPI et FISH, respectivement. Barre d'échelle=10 µm. FISH= hybridation *in situ* en fluorescence, DAPI=L 4',6'-diamidino-2-phénylindole.

Les infections vésicales post-BCG sont souvent de diagnostic difficile, ce qui sous-estime leur prévalence. En effet, la performance diagnostique de l'examen microscopique standard est faible, de l'ordre de 25.3% [7] et la culture de l'urine est parfois stérile [2]. La technique FISH représente un outil diagnostique supplémentaire pour l'investigation microbiologique de biopsie vésicale chez les patients ayant une suspicion de BCGite localisée ou disséminée après BCG thérapie. Ces résultats confirment nos observations précédentes [2] démontrant l'utilité du FISH dans certains diagnostics comme celui de l'anévrisme aortique infecté par le BCG [2].

Remerciements

Ces travaux ont été soutenus par le gouvernement français dans le cadre du programme Investissements d'Avenir géré par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), [référence : Méditerranée Infection 10-IAHU-03]. Ce travail a été soutenu par la Région Le Sud (Provence Alpes Côte d'Azur) et par un financement européen [FEDER PA 0000320 PRIMMI].

References

- [1] Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström P-U, Choi W, et al. Bladder cancer. *Lancet* 2016;388:2796–810. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30512-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30512-8).
- [2] Darriet F, Bernioles P, Loukil A, Saidani N, Eldin C, Drancourt M. Fluorescence *in situ* hybridization microscopic detection of Bacilli Calmette Guérin mycobacteria in aortic lesions: A case report. *Medicine (Balt)* 2018;97:e11321. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011321>.
- [3] Lamm DL, Van Der Meijden APM, Morales A, Brosman SA, Catalona WJ, Herr HW, et al. Incidence and Treatment of Complications of Bacillus Calmette-Guerin Intravesical Therapy in Superficial Bladder Cancer. *J Urol* 1992;147:596–600. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)37316-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)37316-0).
- [4] Pommier JD, Ben Lasfar N, Van Grunderbeeck N, Burdet C, Laouénan C, Rioux C, et al. Complications following intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment for bladder cancer: a case series of 22 patients. *Infect Dis* 2015;47:725–31. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1055794>.
- [5] Oliveira VC, Carrara RCV, Simoes DLC, Saggiaro FP, Carlotti CG, Covas DT, et al. Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of *in situ* hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol Histopathol* 2010;25:1017–24. <https://doi.org/10.14670/HH-25.1017>.
- [6] Loukil A, Kirtania P, Bedotto M, Drancourt M. FISHing *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Use of a *rpoB* DNA Probe Bait. *J Clin Microbiol* 2018;56. <https://doi.org/10.1128/JCM.00568-18>.
- [7] Pérez-Jacoiste Asín MA, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Lumbreras C, Tejido Á, San Juan R, et al. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Infection Following Intravesical BCG Administration as Adjunctive Therapy For Bladder Cancer: Incidence, Risk Factors, and Outcome in a Single-Institution Series and Review of the Literature. *Medicine (Balt)* 2014;93:236–54. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000119>.