



**HAL**  
open science

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

A. Loukil, S.A. Baron, X. Argemi, T. Maubon, C. Eldin

► **To cite this version:**

A. Loukil, S.A. Baron, X. Argemi, T. Maubon, C. Eldin. Microscopic detection of bacillus Calmette–Guérin mycobacteria in bladder biopsy using fluorescence in situ hybridization. *New Microbes and New Infections*, 2021, 39, pp.100826. 10.1016/j.nmni.2020.100826 . hal-03216136

**HAL Id: hal-03216136**

**<https://amu.hal.science/hal-03216136>**

Submitted on 3 Jan 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Version révisée

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

Ahmed Loukil<sup>1\*</sup>, Sophie Alexandra Baron<sup>1</sup>, Xavier Argemi<sup>2</sup>, Thomas Maubon<sup>3</sup>, Carole Eldin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Aix-Marseille Université, IRD, MEPHI, IHU Méditerranée-Infection, Marseille, France.

<sup>2</sup> GIE Almaviva Santé, Clinique Axiom, Aix en Provence, France.

<sup>3</sup> Hôpital privé Résidence du Parc, Marseille, France.

\*Corresponding author: Ahmed Loukil, Aix-Marseille Université, IRD, MEPHI, IHU Méditerranée-Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. Email: [loukilahmed@hotmail.com](mailto:loukilahmed@hotmail.com)

Text word count = **518**

Keywords: Complexe *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG, FISH, Examen microscopique, Cancer de la vessie.

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

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21 Text word count = **518**

22

23 Keywords: Complexe *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG,

24 FISH, Examen microscopique, Cancer de la vessie.

25

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

34 Nous rapportons ici le cas d'un homme âgé de 72 ans aux antécédents de  
35 carcinome urothélial diagnostiqué en janvier 2016 et traité par instillation  
36 intravésicale de BCG (BCGMEDAC, souche RIVM 1173-P2, MEDAC, Lyon, France)  
37 en Mars 2016. En juillet 2016, une cystoscopie de contrôle systématique révèle des  
38 lésions inflammatoires localisées dans le fond de la vessie et de la paroi latérale  
39 gauche, tandis que la résection endoscopique montre un granulome giganto-  
40 cellulaire considéré comme en rapport avec la BCG thérapie. Début 2019, le patient  
41 est hospitalisé pour des troubles de la miction à type d'énurésie, hématurie et  
42 hyperactivité vésicale. L'examen d'une biopsie vésicale montre la persistance d'un  
43 granulome épithélioïde et giganto-cellulaire. En juillet 2019, un scanner thoraco-  
44 abdomino-pelvien ne montre aucune anomalie d'allure infectieuse. Devant la  
45 suspicion de cystite post-BCG, un traitement empirique par ciprofloxacine pendant 3  
46 semaines est initié, qui ne donnera pas d'amélioration des symptômes cliniques.  
47 L'examen moléculaire d'échantillons d'urine par PCR en temps réel (Xpert MTB/RIF,  
48 Cepheid, Sunnyvale, USA) révèle la présence d'ADN de mycobactéries du complexe  
49 *Mycobacterium tuberculosis* sensibles à la rifampicine. La culture sur milieu COSMO  
50 (Eurobio, Les Ulis, France) restera cependant négative à 30 jours. Des sections de

51 biopsie vésicale incluses en paraffine sont examinées par hybridation *in situ* en  
52 fluorescence (FISH) ciblant spécifiquement le gène *rpoB* du complexe *M.*  
53 *tuberculosis* afin de détecter *M. bovis* BCG. Après déparaffinage, les coupes  
54 tissulaires sont traitées avec du noir Soudan (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fancy,  
55 France) pour réduire le bruit de fond autofluorescent [5] et le protocole FISH est  
56 réalisé en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique du complexe *M.*  
57 *tuberculosis*, comme indiqué précédemment [6]. L'observation microscopique et  
58 l'acquisition d'images sont réalisées à l'aide de l'objectif 63x du microscope confocal  
59 Zeiss LSM 800, commandé par le logiciel Zen (Zeiss, Marly-le-Roi, France). Des  
60 mycobactéries BCG sont identifiées dans la section de biopsie vésicale,  
61 apparaissant comme des bacilles fluorescents en rouge, tandis que les noyaux  
62 cellulaires sont visualisés par L 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (signal  
63 fluorescent bleu) (Figure). Un traitement par rifampicine, éthambutol et isoniazide est  
64 alors instauré en association à une corticothérapie.

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

74

75 **Acknowledgments**

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

81 **REFERENCES**

- 82 [1] Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström P-U, Choi W, et al.  
83 Bladder cancer. *The Lancet* 2016;388:2796–810. <https://doi.org/10.1016/S0140->  
84 6736(16)30512-8.
- 85 [2] Darriet F, Bernioles P, Loukil A, Saidani N, Eldin C, Drancourt M. Fluorescence *in*  
86 *situ* hybridization microscopic detection of Bacilli Calmette Guérin mycobacteria  
87 in aortic lesions: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2018;97:e11321.  
88 <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011321>.
- 89 [3] Lamm DL, Van Der Meijden APM, Morales A, Brosman SA, Catalona WJ, Herr  
90 HW, et al. Incidence and Treatment of Complications of Bacillus Calmette-Guerin  
91 Intravesical Therapy in Superficial Bladder Cancer. *J Urol* 1992;147:596–600.  
92 [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)37316-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)37316-0).
- 93 [4] Pommier JD, Ben Lasfar N, Van Grunderbeeck N, Burdet C, Laouénan C, Rioux  
94 C, et al. Complications following intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment  
95 for bladder cancer: a case series of 22 patients. *Infect Dis* 2015;47:725–31.  
96 <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1055794>.
- 97 [5] Oliveira VC, Carrara RCV, Simoes DLC, Saggiaro FP, Carlotti CG, Covas DT, et  
98 al. Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution  
99 of *in situ* hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol*  
100 *Histopathol* 2010;25:1017–24. <https://doi.org/10.14670/HH-25.1017>.
- 101 [6] Loukil A, Kirtania P, Bedotto M, Drancourt M. FISHing *Mycobacterium*  
102 *tuberculosis* Complex by Use of a *rpoB* DNA Probe Bait. *J Clin Microbiol*  
103 2018;56. <https://doi.org/10.1128/JCM.00568-18>.
- 104 [7] Pérez-Jacoiste Asín MA, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Lumbreras C,  
105 Tejido Á, San Juan R, et al. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Infection Following

106 Intravesical BCG Administration as Adjunctive Therapy For Bladder Cancer:  
107 Incidence, Risk Factors, and Outcome in a Single-Institution Series and Review  
108 of the Literature. *Medicine (Baltimore)* 2014;93:236–54.  
109 <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000119>.

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130



131 **Légende de la Figure.**

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

139

140

141

