

## ABSTRACT

**Background:** *Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD), an X-linked recessive disorder, is a muscular disorder caused by the absence or reduction of the muscle cytoskeletal protein dystrophin. Standard procedure to detect deletion and duplication of the DMD gene is using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). However, in Indonesia genetic testing, such as MLPA, is not covered by insurance. Immunohistochemical (IHC) staining of dystrophin from muscle biopsy in the form of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) specimen can be an alternative method to detect dystrophin expression in protein level to establish the diagnosis of DMD or BMD.*

**Objective:** *To determinate sensitivity, specificity and accuracy of IHC analysis of dystrophin in DMD/BMD patient in comparison with standard genetic testing MLPA.*

**Methods:** *Twentysix patients enrolled in this study were clinically diagnosed as DMD/BMD in Dr Sardjito Hospital and Gadjah Mada Academic Hospital. Genomic DNA was isolated from 3 mL of EDTA-peripheral whole blood samples using Qiagen® QIAamp DNA Mini Kit. The deletion and duplication DMD gene were detected by MLPA (SALSA MLPA probemix P034/P035) according to manual procedure (MRC Holland). IHC examination was performed using a specific antibody dystrophin (DYS2) by Novocastra (Leica). Complete loss dystrophin staining indicated DMD, meanwhile partly loss dystrophin staining indicated BMD. MLPA result was used as gold standard to determine sensitivity, spesifity, and accuracy of IHC technique using 2x2 table.*

**Results:** *MLPA result revealed 18 (18/26; 69.3%) patients with deletion and 3 (3/26; 11.5%) patients with duplication. Five (5/26; 19.2%) patients showed no deletion nor duplication, were excluded from the analysis. Among 21 patients with deletion or duplication, 18 (18/21; 85.7%) patients were out-of-frame (DMD) and 3 (3/21; 14.3%) patients were in-frame (BMD). Six patients showed discrepancy of IHC and MLPA result; 9.5% (2/21) false positive and 19% (4/21) false negative. The sensitivity of dystrophin IHC was 77.78%, the specificity was 33.33%, the positive predictive value was 87.5%, the negative predictive value was 20%, and the accuracy was 71.43%.*

**Conclusion:** *Muscle biopsy followed by IHC could be one of the diagnostic tools to diagnose BMD or DMD, with highly sensitivity. The protein-based strategy was probably the most efficient way to approach the diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy in limited health care setting.*

**Keywords:** *Duchenne/Becker muscular dystrophy, Immunohistochemistry, Dystrophin, MLPA*

## ABSTRAK

**Latar Belakang:** *Duchenne muscular dystrophy* (DMD) dan *Becker muscular dystrophy* (BMD), adalah penyakit *X-linked* recessive resesif dimana protein distrofin tidak terbentuk atau terbentuk sebagian. Protokol standar untuk mendeteksi adanya delesi duplikasi gen *DMD* menggunakan *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA). Padahal di Indonesia tes genetik seperti MLPA tidak tercover oleh asuransi. Pulasan imunohistokimia (IHK) distrofin pada biopsi otot menggunakan spesimen *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (FFPE) dapat menjadi alternatif untuk mendeteksi ekspresi distrofin pada level protein untuk digunakan dalam mendiagnosis DMD atau BMD.

**Tujuan:** Menentukan sensitivitas, spesifisitas, dan akurasi IHK distrofin pada pasien DMD/BMD dibandingkan tes genetik standar MLPA.

**Metode:** Dua puluh enam pasien didiagnosis sebagai DMD/BMD di rumah sakit Dr Sardjito dan Akademik Gadjah Mada. DNA genom diisolasi dari 3 mL darah yang diambil dari perifer menggunakan Qiagen® *QIAamp DNA Mini Kit*. Delesi dan duplikasi dideteksi menggunakan MLPA (SALSA MLPA probemix P034/P035) sesuai dengan prosedur manual (MRC Holland). Pemeriksaan IHK dilakukan menggunakan antibody spesifik distrofin (DYS2) dari Novo castra (Leica). Hilangnya ekspresi distrofin merupakan DMD, sementara hilangnya sebagian protein diindikasikan sebagai BMD. Hasil MLPA dipakai sebagai standar baku emas diagnosis untuk menentukan sensitivitas, spesifisitas, dan akurasi teknik IHK menggunakan table 2x2.

**Hasil:** Hasil MLPA memperlihatkan 18 (18/26; 69.3%) pasien dengan delesi dan 3 (3/26; 11.5%) pasien dengan duplikasi. Lima (5/26; 19.2%) pasien dengan hasil tidak ada delesi dan duplikasi di eksklusi dari penelitian ini. Dari 21 pasien dengan delesi atau duplikasi, 18 (18/21; 85.7%) pasien dengan hasil *outframe* (DMD) dan 3 (3/21; 14.3%) pasien *in-frame* (BMD). Enam pasien memperlihatkan diskrepansi antara hasil IHK dan MLPA; 9.5% (2/21) positif palsu and 19% (4/21) negatif palsu. Sensitivitas dan spesifisitas IHK distrofin berturut-turut adalah 77,7% dan 33,3% dengan nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif sebesar 87,5% dan 20% dan akurasi sebesar 71,4%.

**Kesimpulan:** Biopsi otot dilanjutkan dengan pulasan IHK dapat menjadi salah satu alat diagnosis untuk diagnosis BMD atau DMD dengan sensitivitas tinggi. Strategi pemeriksaan berbasis protein merupakan pendekatan diagnosis paling efisien untuk mendiagnosis BMD atau DMD pada layanan Kesehatan yang tidak memiliki fasilitas tes genetik.

**Keywords:** Duchenne/Becker, Imunohistokimia, Distrofin, MLPA