

SO SÁNH GIÁ TRỊ CHẨN ĐOÁN BỆNH HIRSCHSPRUNG GIỮA X QUANG ĐẠI TRÀNG, ĐO ÁP LỰC HẬU MÔN TRỰC TRÀNG VÀ SINH THIẾT HÚT

Hồ Trần Bản¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Hiện nay, nhiều phương pháp chẩn đoán bệnh Hirschsprung. Mỗi phương pháp có ưu, nhược điểm riêng. Tuy nhiên, ít nghiên cứu so sánh các kỹ thuật này tại Việt Nam.

Mục tiêu: Xác định giá trị chẩn đoán bệnh Hirschsprung giữa phương pháp X quang đại tràng, đo áp lực hậu môn trực tràng và sinh thiết hút.

Phương pháp: Đoàn hệ tiến cứu.

Kết quả: Từ 1/1/2015 - 30/9/2020, 304 trường hợp nhập viện tại bệnh viện Nhi Đồng 2. Tuổi trung vị sinh thiết hút 2,5 (1,2 - 12,9) (tháng). Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán âm, giá trị tiên đoán dương của X quang đại tràng lần lượt là 87,8%, 54,3%, 73,3%, 75,7%. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán âm, giá trị tiên đoán dương của đo áp lực hậu môn trực tràng lần lượt là 90,5%, 68%, 89,5%, 70,4%. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán âm, giá trị tiên đoán dương của sinh thiết hút nhuộm Calretinin lần lượt là 99,5%, 96,6%, 99,1%, 97,9%. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán âm, giá trị tiên đoán dương của HE lần lượt là 95,2%, 84,5%, 91,6%, 90,9%.

Kết luận: Sinh thiết hút trực tràng với nhuộm hóa mô miễn dịch Calretinin có giá trị

chẩn đoán bệnh Hirschsprung cao nhất trong nhóm nghiên cứu.

Từ khóa: Calretinin, HE, Hirschsprung, X quang đại tràng, đo áp lực hậu môn trực tràng, sinh thiết hút trực tràng

SUMMARY

COMPARISON OF DIAGNOSTIC VALUE FOR HIRSCHSPRUNG'S DISEASE BETWEEN BARIUM ENEMA, ANORECTAL MANOMETRY, AND SUCTION BIOPSY

Introduction: Currently, there are many diagnostic methods for Hirschsprung disease, each with its own advantages and disadvantages. However, there are few studies comparing these techniques in Vietnam.

Objective: To determine the diagnostic value of Hirschsprung disease between barium enema, anorectal manometry, and suction biopsy.

Method: Cohort study

Results: From January 1, 2015, to September 30, 2020, 304 cases were admitted to Children's Hospital 2. The median age for suction biopsy was 2.5 months (1.2 - 12.9 months). The sensitivity, specificity, negative predictive value, and positive predictive value of barium enema were 87.8%, 54.3%, 73.3%, and 75.7%, respectively. The sensitivity, specificity, negative predictive value, and positive predictive value of anorectal manometry were 90.5%, 68%, 89.5%, and 70.4%, respectively. The sensitivity, specificity, negative predictive value, and positive predictive value of suction biopsy with Calretinin staining were 99.5%, 96.6%, 99.1%,

¹Bệnh viện Nhi Đồng 2

Chịu trách nhiệm chính: Hồ Trần Bản

ĐT: 0989037074

Email: hotranban@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 17/6/2024

Ngày phản biện khoa học: 21/6/2024

Ngày duyệt bài: 27/6/2024

and 97.9%, respectively. The sensitivity, specificity, negative predictive value, and positive predictive value of HE staining were 95.2%, 84.5%, 91.6%, and 90.9%, respectively.

Conclusions: Rectal suction biopsy with immunohistochemical staining for Calretinin has the highest diagnostic value for Hirschsprung disease among the study group.

Keywords: Calretinin, HE, Hirschsprung, barium enema, anorectal manometry, rectal suction biopsy

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay có nhiều phương pháp chẩn đoán bệnh Hirschsprung. X quang đại tràng (XQĐT) rất quan trọng để chẩn đoán bệnh. Dấu hiệu hình phễu cho thấy dẫn phần trên đại tràng vô hạch so với phần dưới không dẫn giúp chẩn đoán⁵. Dấu hiệu này không gặp trong tất cả các trường hợp, tỉ lệ thay đổi từ trung tâm này sang trung tâm khác và phụ thuộc rất nhiều vào kinh nghiệm của người đọc⁵. Đo áp lực hậu môn - trực tràng (ĐALHMTT) là một kỹ thuật được dùng để đo và đánh giá trương lực nhóm cơ thắt vùng hậu môn - trực tràng (cơ thắt trong và cơ thắt ngoài) trong quá trình giữ phân và tổng thoát phân. Phương pháp có độ nhạy 85% – 95%, độ chuyên 89% – 97%⁴. Sự dẫn bóng trực tràng giúp giảm áp lực ống hậu môn gọi là “phản xạ hậu môn - trực tràng” và phản xạ này có ở tất cả người bình thường. Tuy nhiên, vẫn có sự tranh cãi về giá trị của phương pháp này. Hầu hết các trung tâm nhi khoa và phẫu thuật viên không sử dụng ĐALHMTT để chẩn đoán bệnh Hirschsprung. Tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán xác định bệnh Hirschsprung là dựa vào kết quả mô học khi sinh thiết trực tràng^{2, 8}. Nhiều trung tâm trên thế giới nhuộm Hematoxylin - Eosin (HE) thường quy. Kết

quả chẩn đoán dựa vào nhuộm HE đòi hỏi nhà giải phẫu bệnh phải cực kỳ kinh nghiệm trong bệnh Hirschsprung. Hiện nay, chính xác nhất là nhuộm hoá mô miễn dịch Calretinin, chất luôn thiếu trong bệnh nhân Hirschsprung. Đặc biệt chất đánh dấu này có khả năng chẩn đoán bệnh Hirschsprung ở những trường hợp vô hạch toàn bộ đại tràng, trẻ sơ sinh non tháng trong khi những kỹ thuật khác khó phát hiện^{6, 7}. Chính vì vậy, chúng tôi muốn nghiên cứu so sánh giá trị chẩn đoán bệnh Hirschsprung giữa các phương pháp trên.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thiết kế nghiên cứu: đoàn hệ tiến cứu.

Tiêu chuẩn chọn: Tất cả bệnh nhân < 15 tuổi bị nghi ngờ bệnh Hirschsprung trên lâm sàng và X – quang đại tràng, nhập bệnh viện Nhi Đồng 2 từ 1/1/2015 đến 31/3/2020.

Tiêu chí loại trừ: Các bệnh nhi không được sinh thiết hút tại bệnh viện Nhi Đồng 2 hoặc hồ sơ bệnh án lưu trữ không thu thập đầy đủ các thông tin theo bệnh án nghiên cứu.

Thu thập và xử lý số liệu: Thu thập các thông tin theo mẫu phiếu thu thập số liệu từ hồ sơ bệnh án theo tiêu chuẩn chọn và loại mẫu. Số liệu được nhập, xử lý và phân tích bằng Microsoft Excel, SPSS 20. Biến số định lượng trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn, biến số định tính trình bày dưới dạng tỷ lệ %, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán âm, giá trị tiên đoán dương.

Tiêu chuẩn chẩn đoán:

X quang đại tràng có bệnh Hirschsprung: XQĐT có hình ảnh đoạn hình phễu hay RSI < 1.

Đo áp lực hậu môn - trực tràng có bệnh Hirschsprung: không có phản xạ cơ thắt trong.

Nhuộm HE có bệnh Hirschsprung: mẫu mô không có tế bào hạch thần kinh.

Nhuộm HE không có bệnh Hirschsprung: mẫu mô có tế bào hạch thần kinh.

Calretinin (+): khi bắt màu trên các tế bào hạch thần kinh và trên sợi thần kinh, hoặc bắt màu dạng sợi mảnh trên các sợi thần kinh hoặc bắt màu trên tế bào hạch thần kinh rải rác.

Calretinin (-): khi không bắt màu trên toàn bộ mẫu thử hoặc bắt màu các tế bào không đặc hiệu như tế bào đơn nhân hoặc bắt màu trên các sợi thần kinh phi đại.

Sinh thiết hút (+): bệnh nhi có Calretinin (-) cho kết quả bệnh Hirschsprung.

Sinh thiết hút (-): bệnh nhi có Calretinin (+) cho kết quả không bệnh Hirschsprung.

Nguyên tắc xác định chẩn đoán

Đối với bệnh nhân có kết quả chẩn đoán sinh thiết hút là phù hợp bệnh Hirschsprung, chúng tôi kết hợp lấy mẫu bệnh phẩm lớn

(khi phẫu thuật hạ đại tràng) và thực hiện đánh giá tế bào hạch thần kinh ở giữa 2 lớp cơ. Chẩn đoán xác định bệnh Hirschsprung khi bờ dưới phẫu thuật không có tế bào hạch thần kinh. Ngược lại, bệnh nhân có kết quả chẩn đoán sinh thiết hút là không phải bệnh Hirschsprung, chúng tôi theo dõi bệnh nhân trong 6 tháng tiếp theo. Chẩn đoán xác định không phải bệnh Hirschsprung khi bệnh nhân không còn táo bón.

Đạo đức trong nghiên cứu: Nghiên cứu được phê duyệt bởi Hội đồng Y đức của Đại học Y Dược TPHCM và bệnh viện Nhi Đồng 2.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Từ 1/1/2015 - 30/9/2020, 304 trường hợp nhập viện tại khoa ngoại tổng hợp bệnh viện Nhi Đồng 2 thỏa các tiêu chí nhận vào.

Tuổi trung vị sinh thiết hút (tháng): 2,5 (1,2 - 12,9)

Bảng 1: Phân bố bệnh nhân theo giới

Giới	Bệnh Hirschsprung	Không bệnh	P
	n (%)	n (%)	
Nam	146 (77,7)	65 (56)	< 0,01
Nữ	42 (22,3)	51 (44)	
Nam/nữ	3,5	1,3	
Tổng	188	116	

Các phương pháp chẩn đoán bệnh Hirschsprung

Bảng 2: X quang đại tràng

Bệnh	Bệnh	XQĐT (n = 304)		Tổng
		Có bệnh n (%)	Không bệnh n (%)	n (%)
Hirschsprung	Bệnh	165 (54,3)	23 (7,6)	188 (54,9)
	Không bệnh	53 (17,4)	63 (20,7)	116 (38,1)
	Tổng	218 (71,7)	86 (28,3)	304 (100)

53 (17,4%) trường hợp dương giả, 23 (7,6%) trường hợp âm giả trong XQĐT.

Bảng 3: Đặc điểm đo áp lực hậu môn - trực tràng

		ĐALHMTT (n = 46)		Tổng
		Có bệnh n (%)	Không bệnh n (%)	n (%)
Bệnh Hirschsprung	Bệnh	19 (41,3)	2 (4,3)	21 (45,6)
	Không bệnh	8 (17,4)	17 (37)	25 (54,4)
	Tổng	27 (58,7)	19 (41,3)	46 (100)

Dương giả (8 trường hợp) trong ĐALHMTT.

Bảng 4: Sinh thiết hút với nhuộm HE

		Nhuộm HE		Tổng
		Không có tế bào hạch thần kinh (có bệnh)	Có tế bào hạch thần kinh (không bệnh)	
Bệnh Hirschsprung	Bệnh	179	9	188
	Không bệnh	18	98	116
	Tổng	197	107	304

Khảo sát tiêu bản HE của 304 trường hợp và có kết luận có tế bào hạch thần kinh là 107 trường hợp, có 64 trường hợp hiện diện tế bào hạch thần kinh trưởng thành điển hình với bào tương rộng, bắt màu Eosin đậm, hạt nhân rõ ràng, chiếm 59,8%; có 43 trường hợp hiện diện tế bào hạch thần kinh với bào tương hẹp, nhân đậm hơn, chiếm 40,2%

Bảng 5: Sinh thiết hút với nhuộm Calretinin

		Nhuộm Calretinin		Tổng
		Có bệnh	Không bệnh	
Bệnh Hirschsprung	Bệnh	187	1	188
	Không bệnh	4	112	116
	Tổng	191	113	304

Nhuộm HMMD có Calretinin (+) trên sợi thần kinh giúp phát hiện bệnh Hirschsprung ở 14/18 trường hợp không thấy tế bào thần kinh trên tiêu bản HE.

Bảng 7: Giá trị của các phương pháp chẩn đoán

Chẩn đoán	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	Giá trị tiên đoán âm	Giá trị tiên đoán dương
XQĐT	87,8%	54,3%	73,3%	75,7%
ĐALHMTT	90,5%	68%	89,5%	70,4%
Nhuộm HE	95,2%	84,5%	91,6%	90,9%
Nhuộm Calretinin	99,5%	96,6%	99,1%	97,9%

IV. BÀN LUẬN

➤ Giới

Đa số trẻ Hirschsprung trong nghiên cứu của chúng tôi là nam, chiếm tỉ lệ 77,7% tương tự như y văn⁶.

So sánh sinh thiết hút với X quang đại tràng và đo áp lực hậu môn - trực tràng

Chúng tôi ghi nhận độ nhạy, độ đặc hiệu của 3 phương pháp chẩn đoán trong nghiên cứu tương tự như tác giả de Lorijin (bảng 8).

Năm 2006, tác giả de Lorijin thực hiện nghiên cứu gộp, thống kê tất cả các nghiên cứu từ sau năm 1966 trên PUBMED và sau năm 1980 trên EMBASE⁴.

Bảng 8: So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu với nghiên cứu de Lorijin

		Chúng tôi	de Lorijin⁴
X quang đại tràng	Độ nhạy (%)	87,8	70 (64 – 76)
	Độ chuyên (%)	54,3	83 (74 – 90)
Đo áp lực hậu môn - trực tràng	Độ nhạy (%)	90,5	91 (85 – 95)
	Độ chuyên (%)	68	94 (89 – 97)
Sinh thiết hút	Độ nhạy (%)	99,5	93 (88 – 95)
	Độ chuyên (%)	96,6	98 (95 – 99)

Nghiên cứu của chúng tôi, X quang đại tràng có độ nhạy thấp nhất so với sinh thiết hút và đo áp lực hậu môn - trực tràng. Giải thích cho việc độ nhạy thấp trong X quang đại tràng, đặc biệt ở những trẻ sơ sinh, là do đoạn chuyển tiếp trên phim không rõ ràng⁴. Ngoài ra, 75% trẻ vô hạch toàn bộ đại tràng có khẩu kính đại tràng bình thường⁴. Thụt tháo hoặc thăm khám trực tràng làm tháo hết phân và hơi cũng có thể dẫn đến độ nhạy thấp⁴. Sinh thiết hút và đo áp lực hậu môn - trực tràng ít khi cho âm tính giả. Độ nhạy thấp của đo áp lực hậu môn - trực tràng có thể do di lệch đầu dò đo áp lực và dẫn cơ thắt trong (ức chế cơ thắt trong) bị làm bởi dẫn cơ thắt ngoài⁴. Trong sinh thiết hút trực tràng, độ nhạy thấp có thể do vị trí sinh thiết chưa đúng (vị trí đúng là 2 – 3 cm trên đường lược), dao hút quá nông, không còn sắc do sử dụng lại nhiều lần và chỉ sinh thiết được niêm mạc mà không có lớp cơ niêm, do kỹ thuật nhuộm hoặc do kinh nghiệm của nhà giải phẫu bệnh⁴.

Độ đặc hiệu cao cũng rất cần thiết trong quá trình chẩn đoán trên những trẻ nghi ngờ bệnh Hirschsprung. Độ đặc hiệu thấp gặp nhiều trong X quang đại tràng. Rosenfield mô tả 4 trường hợp trẻ sơ sinh mắc hội chứng nút phân su cho hình ảnh tương tự như đoạn chuyển tiếp trong bệnh Hirschsprung

tại đại tràng góc lách⁴. Độ đặc hiệu thấp trong đo áp lực hậu môn - trực tràng có thể do bơm bóng không đủ áp lực, hoặc hệ thống bị rò khí, hoặc chức năng sinh lý của hậu môn - trực tràng chưa trưởng thành (nhóm trẻ sơ sinh)⁴. Dương tính giả trong sinh thiết hút trực tràng hiếm gặp⁴.

Kết quả “không thể kết luận” thường gặp nhất ở phương tiện chẩn đoán sinh thiết hút. Nguyên nhân do mẫu mô sinh thiết quá nông không lấy được lớp dưới niêm để khảo sát. Ngược lại, X quang đại tràng không có kết quả “không thể kết luận”⁴. Chúng tôi không ghi nhận trường hợp không thể kết luận do đã chủ động chỉ nhận vào những mẫu đủ lớp.

So sánh sinh thiết hút nhuộm Calretinin với nhuộm HE

➤ Nhuộm Hematoxylin - Eosin (HE)

Sự hiện diện của tế bào hạch thần kinh

Trên tiêu bản HE, chẩn đoán loại trừ bệnh Hirschsprung khi phát hiện tế bào hạch thần kinh. Trong nghiên cứu này, tế bào hạch thần kinh hiện diện trên 107 trường hợp. Tuy nhiên, không bệnh Hirschsprung thực sự chỉ có 98/107 trường hợp. Đối với hầu hết các trường hợp, tế bào hạch thần kinh đứng thành từng nhóm 2 - 5 tế bào và nằm dưới cơ niêm. Tuy nhiên, vẫn có những ca tế bào hạch thần kinh đứng riêng lẻ gây khó khăn và nhầm lẫn trong quá trình chẩn đoán nếu

chỉ dựa vào tiêu bản HE. Ruột bị viêm trong thời gian dài dẫn đến sự phát triển của tế bào viêm, các hạch bạch huyết ở ngay dưới niêm mạc, cũng là hai yếu tố gây khó khăn trong chẩn đoán nếu không có hỗ trợ từ HMMD. Nhuộm HMMD Calretinin giúp phát hiện các trường hợp không phải bệnh Hirschsprung còn lại. Trong nghiên cứu này, có 4 trường hợp tế bào hạch thần kinh đứng rải rác, ít và không tập trung thành cụm 2 - 5 tế bào như những trường hợp bình thường khác. Những trường hợp này, đòi hỏi người đọc tiêu bản HE phải có kinh nghiệm và cẩn thận tránh bỏ sót. Tuy nhiên, với sự hỗ trợ của tiêu bản HMMD Calretinin thì việc nhận diện các tế bào thần kinh dễ dàng hơn.

Sự trưởng thành của tế bào hạch thần kinh

Chúng tôi khảo sát sự trưởng thành của tế bào hạch thần kinh dựa trên hình thái tế bào. Nghiên cứu có 107 trường hợp kết luận có tế bào hạch thần kinh, trong đó 43 trường hợp (chiếm 40,2%) tế bào hạch thần kinh được đánh là chưa trưởng thành. Khi quan sát và so sánh những tế bào được cho là chưa trưởng thành trên tiêu bản HE và trên tiêu bản HMMD Calretinin, chúng tôi nhận thấy hầu hết các tế bào chưa trưởng thành có xu hướng bắt màu nhuộm HMMD đậm hơn so với tế bào trưởng thành. Hơn nữa, không phải tế bào hạch thần kinh trưởng thành nào cũng bắt màu nhuộm HMMD³.

➤ Nhuộm hóa mô miễn dịch Calretinin

Kết quả nhuộm HMMD cho thấy sự hiện diện của Calretinin trên mẫu mô ruột tập trung ở 3 nhóm sau: tế bào hạch thần kinh, sợi thần kinh và mô bào. Trong đó, mô bào là dương không đặc hiệu nhưng lại là những tế bào giúp cho quá trình đánh giá chất lượng tiêu bản HMMD. Nếu các mô bào dương

nhều chứng tỏ tiêu bản nhuộm tăng biểu hiện Calretinin do kỹ thuật. Có thể do thời gian ủ kháng thể quá dài, thời gian bộc lộ kháng nguyên quá lâu hoặc nồng độ kháng thể quá cao; từ đó phải điều chỉnh để giảm sự biểu hiện Calretinin của mô bào. Đồng thời, nhằm đảm bảo sự biểu hiện của Calretinin là đúng, những ảnh hưởng từ các yếu tố kỹ thuật nhuộm HMMD đã được loại trừ, chúng tôi thực hiện nhuộm mẫu bệnh nhân với mẫu chứng là mô ruột già bình thường trên mỗi tiêu bản nhuộm. Sự biểu hiện của Calretinin trên những sợi thần kinh rất là đặc hiệu để loại trừ bệnh Hirschsprung. Tuy nhiên, cần phân biệt rõ ràng giữa Calretinin dương tính trên sợi thần kinh và dương tính trên sợi thần kinh phì đại. Dương tính trên sợi thần kinh phì đại được xem là âm tính và không có ý nghĩa trong chẩn đoán loại trừ bệnh Hirschsprung. Theo Đặng Hoàng Minh, Calretinin dương trên sợi thần kinh có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong chẩn đoán giải phẫu bệnh những trường hợp mẫu bị lỗi chỉ có niêm mạc hoặc chỉ lấy tới cơ niêm, không thể đánh giá bằng tiêu bản nhuộm HE được. Những trường hợp này, Calretinin sẽ dương tính trên những sợi thần kinh xen kẽ vào lớp mô đệm dưới niêm mạc, điều này chứng tỏ có sự hoạt động bình thường của hệ thống thần kinh ruột và loại trừ bệnh Hirschsprung¹. Trên tế bào hạch thần kinh, sự biểu hiện của Calretinin có một số điểm khác biệt và không đồng nhất. Theo y văn và hướng dẫn của nhà sản xuất, nhuộm HMMD Calretinin bắt màu trên cả nhân và bào tương¹. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tất cả các trường hợp có tế bào hạch thần kinh và nhận thấy: không phải tế bào hạch thần kinh nào cũng dương trên nhân, một số tế bào chỉ dương trên bào tương. Trong một nhóm tế bào hạch thần

kinh thì vẫn có những tế bào không dương tính có bào tương rộng và nhân sáng, mịn. Trên tiêu bản HE, những tế bào này thể hiện là một tế bào trưởng thành. Đường như, biểu hiện của Calretinin cũng mờ nhạt hơn ở những tế bào thần kinh thuộc đám rối Auerbach so với tế bào thần kinh thuộc đám rối Meissner. Ngoài ra, khi kiểm tra mô chứng, chúng tôi nhận thấy những tế bào hạch thần kinh thuộc đám rối Auerbach có xu hướng bắt màu mờ nhạt, trong khi những tế bào hạch thần kinh thuộc đám rối Meissner vẫn bắt màu Calretinin đậm. Điều này có lẽ phụ thuộc vào chức năng sinh lý khác nhau của hai đám rối.

V. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu, sinh thiết hút trực tràng với nhuộm hóa mô miễn dịch Calretinin có giá trị cao nhất trong chẩn đoán bệnh Hirschsprung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Hoàng Minh** (2016), "Vai trò của nhuộm hóa mô miễn dịch trong chẩn đoán bệnh phình đại tràng bẩm sinh", Luận văn Thạc sĩ Y học, Đại học Y Dược TPHCM, TPHCM.
2. **Ambartsumyan L, Smith C, Kapur RP.** (2020), "Diagnosis of Hirschsprung Disease", *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 23, pp. 8-22.
3. **Chi S, Fang M, Li K, Yang L, Tang ST.** Diagnosis of Hirschsprung's Disease by Immunostaining Rectal Suction Biopsies for Calretinin, S100 Protein and Protein Gene Product 9.5. *J Vis Exp.* 2019 Apr 26;(146).
4. **De Lorijn F, Kremer LC, Reitsma JB, Benninga MA.** (2006), "Diagnostic tests in Hirschsprung disease: a systematic review", *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 42, pp. 496-505.
5. **Garcia R, Arcement C, Hormaza L, Haymon ML, Ward K, Velasco C, et al.** (2007), "Use of the recto – sigmoid index to diagnose Hirschsprung's disease", *Clinical pediatrics*, 46, pp. 59-63.
6. **Guinard-Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, Philippe-Chomette P, Alberti C, El Ghoneimi A, et al.** (2009), "Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease", *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 22, pp. 1379-1384.
7. **Marta J, Ondřej S, Jiří T.** (2019), "Immunohistochemical diagnostics of Hirschsprung's disease using calretinin", *Ceskoslovenska patologie*, 55, pp. 53-59.
8. **Serafini S, Santos MM, Tannuri ACA, Di Loreto C, Gonçalves JO, Tannuri U.** A new systematization of histological analysis for the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2023 Apr 17;78:100198.