

# Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto; una propuesta de trabajo

## Proposed Recommendations and Guidelines for Diagnosis of Hirschsprung's Disease in Mucosal and Submucosal Biopsies from the Rectum

Lina Eugenia Jaramillo Barberi, MD.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Profesora Asociada Universidad Nacional de Colombia. Patóloga Fundación Hospital de La Misericordia, Bogotá, Colombia.  
e-mail: millito59@hotmail.com

Fecha recibido: 02-11-11  
Fecha aceptado: 22-11-11

### Resumen

Aunque el estreñimiento es frecuente en la población infantil, la mayoría de los niños no tienen una patología estructural y solo en un pequeño porcentaje hay una causa orgánica como la disganglioneosis intestinal. De estas, la más común es la enfermedad de Hirschsprung (EH), un desorden del desarrollo del sistema nervioso entérico caracterizado por la ausencia de células ganglionares en el colon distal que ocasiona una obstrucción funcional. El diagnóstico se establece por biopsia rectal y requiere manejo quirúrgico.

No contamos en nuestro país con pautas claras para el estudio de estos pacientes y es por eso que casi la mitad de los niños con EH se diagnostican tardíamente, después del año de vida.

Este artículo propone pautas de manejo y recomendaciones tanto para el cirujano como para el patólogo, en un intento de facilitar el estudio de los pacientes con síntomas de estreñimiento y sospecha de aganglioneosis.

### Palabras clave

Estreñimiento, biopsias rectales, disganglioneosis intestinal, células ganglionares, aganglioneosis, enfermedad de Hirschsprung.

### Abstract

Although constipation is common in children, most children have no structural disease, and only a small percentage of them have an organic cause for diseases such as intestinal dysganglioneosis. Of these the most common is Hirschsprung's disease (HD), a disorder of the enteric nervous system's development characterized by the absence of ganglion cells in the distal colon that causes functional obstruction. A diagnosis is established by rectal biopsy which requires surgery.

In Colombia there are no clear guidelines for the study of these patients. This results in late diagnoses of almost half of the children with HD after one year of age. This article proposes recommendations and management guidelines for both the surgeon and the pathologist in an attempt to facilitate the study of patients with symptoms of constipation and suspected aganglioneosis.

### Key words

Constipation, rectal biopsies, intestinal dysganglioneosis, ganglion cells, aganglioneosis, Hirschsprung's disease.

## INTRODUCCIÓN

El estreñimiento crónico es frecuente en la población infantil y se calcula que el 8% de los niños lo presentan en algún momento de su vida; aproximadamente 3 al 5% de las con-

sultas al pediatra y entre el 10 y 25% al gastroenterólogo pediatra se hacen por este motivo (1). La mayoría de los pacientes tiene un estreñimiento funcional que puede ser manejado por médicos pediatras. Los pacientes con estreñimiento severo deben ser estudiados para causas orgánicas

como malformaciones anatómicas, trastornos endocrinos, neurológicos y metabólicos (2). Aquellos niños que tienen estreñimiento desde el periodo neonatal o que persisten con síntomas crónicos que no responden al tratamiento, deben ser remitidos para estudio de neuropatía entérica con toma de biopsias rectales.

La enfermedad de Hirschsprung (EH) es un desorden del desarrollo del sistema nervioso entérico y se caracteriza por la ausencia de células ganglionares en el colon distal que ocasiona una obstrucción funcional. Una vez que se confirma el diagnóstico, el tratamiento básico es remover el segmento agangliónico y crear una anastomosis del intestino bien innervado al recto distal (3).

Para el diagnóstico de esta entidad hay que tener un claro entendimiento de la histología del sistema nervioso entérico. Existen tres plexos nerviosos: Auerbach o mientérico, que está localizado entre las dos capas de la muscular propia; Henle, localizado encima de la capa circular de la muscular propia y Meissner, el más superficial, localizado debajo de la muscular de la mucosa. En una biopsia de mucosa-submucosa generalmente se evalúa el plexo de Meissner pero en ocasiones, cuando son lo suficientemente profundas puede incluso observarse el plexo de Henle. Los plexos normales se componen de neuronas (células ganglionares) y células de soporte (glía). El hallazgo histológico característico de la EH es la ausencia total de células ganglionares y un aumento en la densidad estructural de los plexos, donde las células gliales son reemplazadas por células de Schwann que se hipertrofian y toman un aspecto similar al de un nervio periférico (3).

El diagnóstico de la EH continúa siendo un problema en nuestro país porque buena proporción de patólogos no se sienten cómodos realizando este estudio, en gran medida por la dificultad de evaluar el material enviado por el cirujano ya que no existe una guía de manejo que le garantice el buen rendimiento de la biopsia. Este reporte detalla algunas recomendaciones basadas en mi experiencia de trabajo durante más de 20 años en un hospital pediátrico que se ha convertido en sitio de referencia para este tipo de estudio.

Para dar una idea de la casuística en nuestro hospital, durante los años 2005 al 2009 realizamos 272 estudios de niños con sospecha de EH; de estos, 106 correspondían a pacientes de nuestra institución y 166 eran casos remitidos para diagnóstico o para una segunda opinión. La mayoría eran biopsias de mucosa-submucosa y el promedio de niveles biopsiados por paciente fue de 3,13 (2,3 a 5). Durante este periodo, 56 pacientes fueron diagnosticados como EH, equivalente al 20,58% (4), una incidencia alta si se compara con la literatura (5), cosa que explicamos más probablemente porque al ser una institución de referencia nuestros casos vienen más seleccionados que en la población general. La relación fue de 44 hombres y 12 mujeres

con una proporción de 3,66:1, similar a la descrita en la literatura (5).

Las publicaciones de estudios en países industrializados reportan que más de las dos terceras partes de los pacientes con EH se diagnostican durante el periodo neonatal y casi un 95% antes del año de edad (5, 6); en nuestra casuística encontramos que de los 56 pacientes a quienes se les hizo diagnóstico de EH, el 44,64% eran mayores de un año, 33,92% tenían de 1 a 11 meses y solamente el 14,28% eran neonatos (7); en el 7,16% restante no tenemos referencia de la edad. Esta situación refleja un problema en nuestra oportunidad diagnóstica, donde se mezclan probablemente factores como la falta de consenso en el manejo del estreñimiento por parte del pediatra, falta de criterios establecidos para realizar la biopsia rectal y los informes equívocos o inexactos que se obtienen de los estudios histopatológicos.

Nuestro alto volumen de casos extrainstitucionales (61,03%) pone en evidencia la falta de confianza que tienen los cirujanos pediatras en los patólogos generales para hacer el estudio del paciente con estreñimiento. Esto, a su vez plantea la necesidad de elaborar un protocolo de manejo del material de biopsia rectal para garantizar una buena orientación, enfatizar la obligatoriedad de un seriado amplio y homologar los informes de patología. Es por todo lo anterior que el objetivo de esta revisión es compartir mi experiencia y hacer recomendaciones para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung.

## PASO A PASO

Una de las mayores responsabilidades que tenemos ante la realización y el estudio de una biopsia rectal por estreñimiento es garantizar que el material sea tomado, fijado, manejado y cortado de una forma correcta para así aumentar las probabilidades de que este sea adecuado para el diagnóstico. Para lo anterior hay pasos a cargo del cirujano y del patólogo que pueden optimizar los resultados así:

**El cirujano debe:** Obtener un número adecuado de biopsias rectales, de buen tamaño, con adecuada profundidad y fijarlas de inmediato en formol al 10%. Se recomienda biopsiar al menos 3 niveles que deben ir debidamente marcados indicando a cuántos centímetros de la línea pectínea fue tomada cada uno.

### El patólogo debe:

- Orientar y cortar los especímenes.
- Solicitar al histotecnólogo un seriado que oscile entre 50 y 100 cortes teñidos con hematoxilina & eosina.
- Evaluar el material histológico y si lo considera inadecuado para el estudio, informarlo como tal.

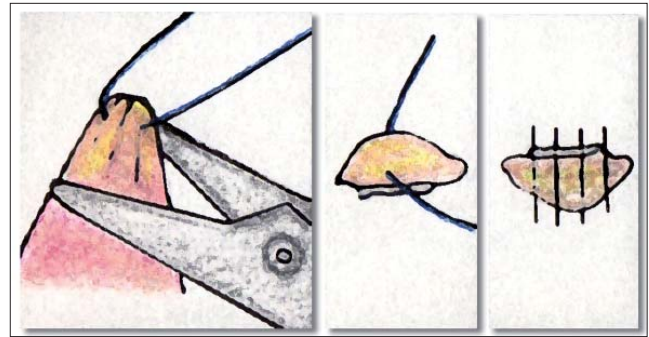
- Tener conceptos claros sobre los hallazgos clásicos de una EH.
- Tener presente otros diagnósticos diferenciales cuando sean pertinentes.

En ninguno de los hospitales de nuestro país contamos con la técnica de tinción histoquímica para la enzima acetilcolina (AChE) como marcador de las fibras nerviosas de la lámina propia y muscular de la mucosa, considerada por muchos como la prueba reina para el diagnóstico de EH (8). Múltiples instituciones cuentan solo con técnicas de rutina y cada vez más laboratorios tienen acceso a marcadores de inmunohistoquímica que aunque en la mayoría de casos no son indispensables para el diagnóstico, en ocasiones pueden ser de gran utilidad.

La clave del éxito del estudio inicia entonces en el momento de la toma de la muestra. En nuestra institución no contamos con equipos de biopsia por succión por lo que el material se obtiene por biopsia transrectal, realizada en salas de cirugía con anestesia general. Se coloca el paciente en decúbito ventral, se dilata el recto con un espéculo nasal dejando expuesta su pared anterior, se escoge el nivel a biopsiar, se pasa un punto de sutura ligeramente por debajo de la mucosa, se jala levantando la submucosa y se corta el fragmento con tijera (figura 1). El número de niveles a tomar varía en las diferentes escuelas; en nuestra institución, desde hace poco más de un año, se decidió por consenso del Servicio de Cirugía, pasar de 3 a 5 niveles que se toman a 1, 2, 3, 4 y 5 cm de la línea pectínea. El tamaño de la biopsia oscila generalmente entre 0,3 a 0,5 cm, suficiente si se tiene cuidado en su manejo. Como recomendación de parte del servicio de patología, le sugerimos al cirujano que evite las zonas donde la mucosa tiene un aspecto micronodular ya que estos levantamientos generalmente corresponden a agregados linfoides que ocupan la submucosa y desplazan el plexo de Meissner en profundidad, quedando en muchas oportunidades fuera del tejido obtenido en la biopsia.

A diferencia de las biopsias de rutina en las que el patólogo se limita a contar los fragmentos recibidos, medirlos y ponerlos en el casete de procesamiento, la biopsia para estudio de EH debe ser orientada por el especialista ya que en este caso la capa indispensable para el diagnóstico es la submucosa y debe garantizarse que al incluir el tejido esta quede bien representada. Recomendando colocar el fragmento sobre un papel con la mucosa hacia abajo, estirarla con cuidado de no aplastar el tejido y realizar cuantos cortes paralelos sean posibles (por el eje menor) con distancia aproximada de 0,10 cm entre ellos (figuras 2 y 3). El propósito de este procedimiento es evitar en la medida de lo posible las inclusiones oblicuas donde queda muy poca submucosa representada o de “cabeza” donde todo el tejido

observable corresponde a mucosa rectal o muscular de la mucosa (figura 4).



**Figura 1.** Toma de la biopsia, identificación y orientación de la muestra para realizar los cortes transversales.



**Figura 2.** Biopsia endorrectal de 0,5 cm que incluye mucosa y submucosa.

Teniendo en cuenta que el técnico ha recibido una orientación del tipo de muestra que le estamos remitiendo (en nuestro servicio previamente le hemos mostrado las figuras 2 y 3, explicándoles que a diferencia de otras biopsias del tracto gastrointestinal, en estas la parte clave para el estudio es la submucosa); enviamos el material con orden de “serrar para inervación”, lo que significa hacer de cada bloque dos o tres láminas con un promedio de 12 a 15 cortes en cada una (figura 5). Si tenemos en cuenta que cada fragmento se ha dividido en 2, 3 ó 4 pedazos esto da entre 60 y 120 niveles por biopsia. Es importante ordenar el seriado desde el principio ya que garantiza que no se desperdicie tejido en la “monta” y “remonta” del bloque. La mayoría de las veces

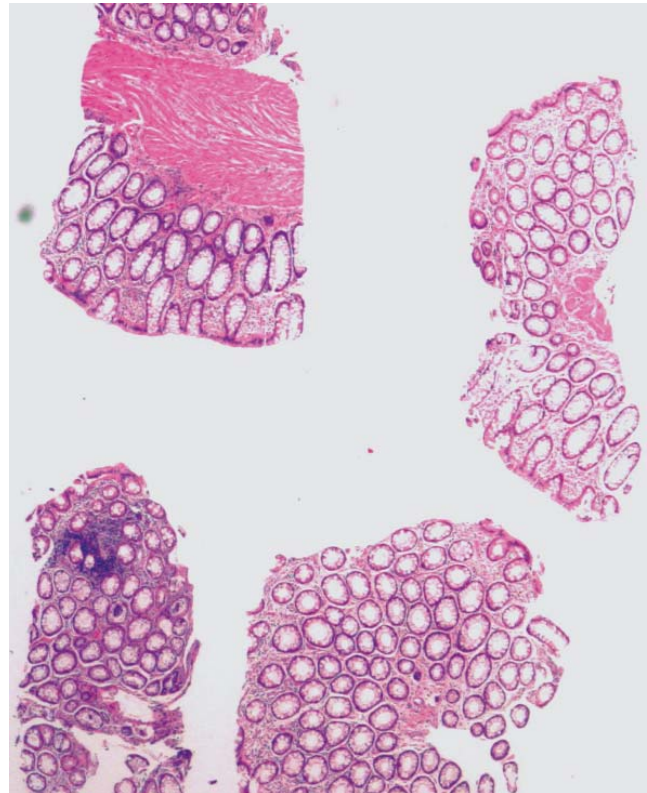


este seriado es suficiente para diagnosticar o descartar una aganglionosis. Al mismo tiempo, generalmente queda un pequeño remanente de tejido en el bloque que puede ser utilizado en casos problema para aumentar el seriado o para complementar con técnicas de inmunohistoquímica.



**Figura 3.** Aspecto del espécimen anterior luego de los cortes transversales.

Es muy importante que el patólogo, así no sea un experto en EH, maneje conceptos claros sobre los hallazgos clásicos de esta enfermedad. No puede confundirse el “no veo células ganglionares” con el “no hay células ganglionares”. Ya que esta es una enfermedad donde el diagnóstico se basa en la ausencia de un elemento en la histología, es indispensable que el patólogo esté seguro de que ha garantizado tanto en la técnica como en los conocimientos que todo es consistente con una aganglionosis. En términos generales la EH clásica, es decir la de segmento corto (75-80% de los casos) que compromete la parte distal del colon sigmoides y el recto, se caracteriza histológicamente por tener filetes nerviosos gruesos, grandes (generalmente mayores de 40 micras de diámetro), compactos y por supuesto sin células ganglionares. Si los filetes son escasos, pequeños o laxos, así no se vean neuronas, es válido poner en duda el diagnóstico y sospechar otras enfermedades (3, 9). Es importante recordar que en la aganglionosis de segmento largo y en especial en la aganglionosis total del colon, puede, contrario a lo usual, existir una disminución o casi ausencia de plexos y es en estos casos, como en casi todos los estudios de patología, donde la historia clínica y la correlación son indispensables para orientar al patólogo.



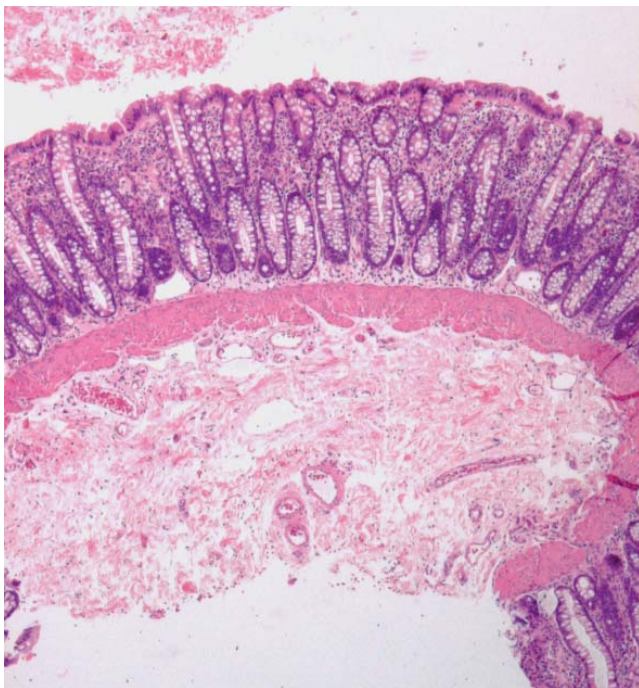
**Figura 4.** Material inadecuado para estudio de inervación: no hay submucosa para evaluar.



**Figura 5.** Seriado realizado a cada nivel de biopsia transrectal enviada para estudio.



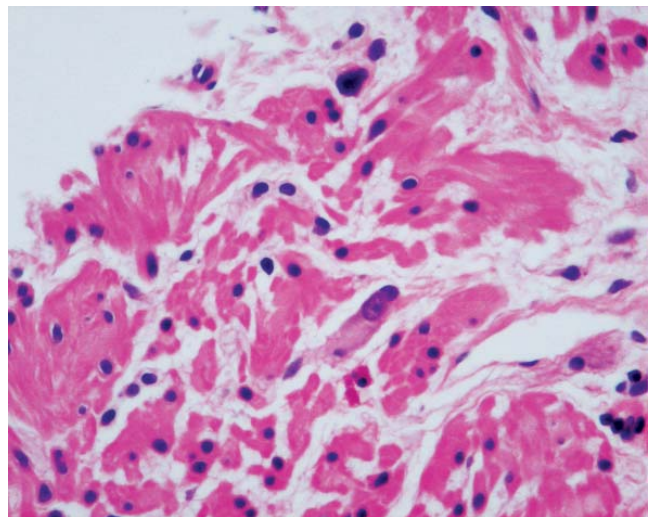
Es igualmente de vital importancia determinar cuándo una biopsia es insuficiente o inadecuada para el diagnóstico. Desde el punto de vista anatómico se recomienda que el nivel inferior de toma de la muestra sea de 1, idealmente 2 cm por encima de la línea pectínea. Las biopsias muy bajas o cercanas al esfínter anal pueden normalmente no tener células ganglionares sin que necesariamente signifique que el paciente tiene aganglionosis. Cuando en una biopsia no hay células ganglionares y se observan islas de epitelio escamoso o fibras musculares del esfínter, es firma inequívoca de que se obtuvo debajo de la línea pectínea y debe siempre informarse como inadecuada para diagnóstico. Si existen dudas del sitio de toma de la muestra recomiendo hacer una nota para recordarle este concepto al clínico y así evitar interpretaciones erradas. Desde el punto de vista histológico se considera que la biopsia rectal es adecuada cuando la cantidad de mucosa y muscular de la mucosa (sumadas) es equivalente en espesor a la cantidad de submucosa (figura 6) (10). Si la submucosa es de buen tamaño pero está ocupada por un folículo linfoide debe igualmente considerarse inadecuada para el diagnóstico de EH (figura 7). Ante cualquier tipo de muestra recibida, el patólogo debe mirar juiciosamente todos los cortes ya que en ocasiones se identifican neuronas en la periferia del folículo o inmersas en la muscular de la mucosa, lo que permite sin lugar a dudas descartar la aganglionosis aun en biopsias que parecerían inadecuadas para el estudio (figura 8).



**Figura 6.** Biopsia adecuada para estudio de inervación donde la cantidad de submucosa es equivalente en espesor a la sumatoria de la mucosa y muscular de la mucosa. (H&E 40X).



**Figura 7.** Material inadecuado para estudio de inervación: la submucosa está ampliamente ocupada por un folículo linfoide quedando muy escaso tejido para evaluar. (H&E 40X).



**Figura 8.** Célula ganglionar observada en medio de la muscular de la mucosa permitiendo descartar la enfermedad de Hirschsprung. (H&E 400X).

El diagnóstico más fácil de establecer en las biopsias de mucosa-submucosa de recto es el de inervación normal; de hecho es el que se hace con mayor frecuencia y generalmente con la revisión de unos pocos niveles ya es suficiente para confirmarlo.

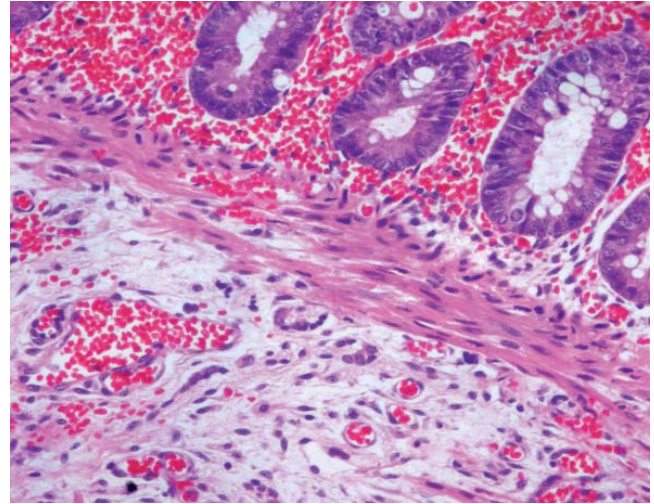


Por otro lado, en algunas ocasiones es importante tener presente otros diagnósticos diferenciales. Las biopsias de mucosa-submucosa no son adecuadas para descartar entidades como miopatías o hipoganglioneosis pero permiten confirmar una inmadurez del plexo y plantear sospecha de displasia neuronal intestinal (DNI) (6, 7). Esta última es una entidad que ha suscitado muchas discusiones y de hecho, mientras algunos patólogos consideran que no existe, otros la aceptan solo como un desorden secundario, asociado a problemas de motilidad intestinal como la EH. Los criterios más recientes determinan que para establecer el diagnóstico de DNI deben examinarse mínimo 25 ganglios submucosos y encontrar que al menos el 20% de ellos son gigantes (que tienen más de 8 células ganglionares en un corte transversal); se recomienda tomar las biopsias 8 a 10 cm por encima de la línea dentada y se especifica que este diagnóstico nunca debe hacerse en niños menores de 1 año de edad (6). Prácticamente nunca, al menos en nuestra institución, se hacen biopsias endorrectales a un nivel tan alto como 10 cm por encima de la línea pectínea. Por lo anterior, cuando encontramos un cuadro de “hiperganglioneosis” en la submucosa de un paciente mayor de 1 año hacemos referencia al hallazgo y sugerimos que lo correlacionen con la clínica y radiología para descartar la posibilidad de una DNI. Si el cirujano lo considera pertinente entonces hace un mapeo obteniendo 5 biopsias endorrectales al mismo nivel para hacer el conteo mínimo necesario para confirmar o descartar la displasia.

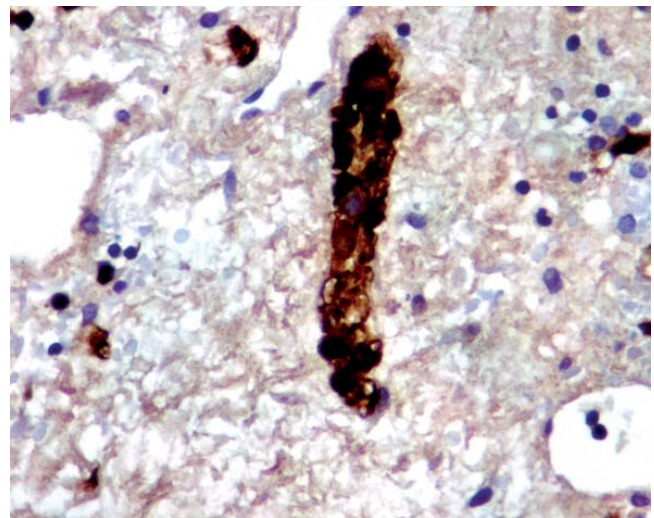
En ocasiones lo que observamos es la presencia de un patrón de inervación muy inmaduro con células ganglionares similares a las del neonato prematuro donde aparecen agregadas en estructuras rosetoides con mínima cantidad de neuropilo y su morfología es diferente a la de una neurona madura ya que son células más pequeñas, con núcleo más oscuro, excéntrico, nucléolo no tan prominente y citoplasma elongado de menor tamaño, gris-azulado (11, 12). Es importante aprender a reconocer estas células pues el no interpretarlas correctamente puede llevar a diagnósticos errados de aganglioneosis (figura 9).

Cuando luego de ser una biopsia de buena calidad no se observan células ganglionares, no recomiendo hacer estudios de inmunomarcación específica para neuronas (BCL2 o NSE) ni para células de Schwann (S100 o Syanptofisina) pues las imágenes son difíciles de interpretar (figura 10) y tengo la opinión de que si en 60 a 120 niveles no se identificaron las neuronas, es muy difícil que en los dos o tres niveles que se hacen para la inmunohistoquímica tengamos la suerte de encontrar de forma clara e inequívoca el cuerpo neuronal que no se vio en el seriado. Cuando el problema es definir si las células observadas son neuronas inmaduras, considero que la inmunohistoquímica puede ayudar a aclarar el diagnóstico y recomiendo utilizar marcadores

convencionales para neuronas como los ya nombrados: NSE y/o BCL2.



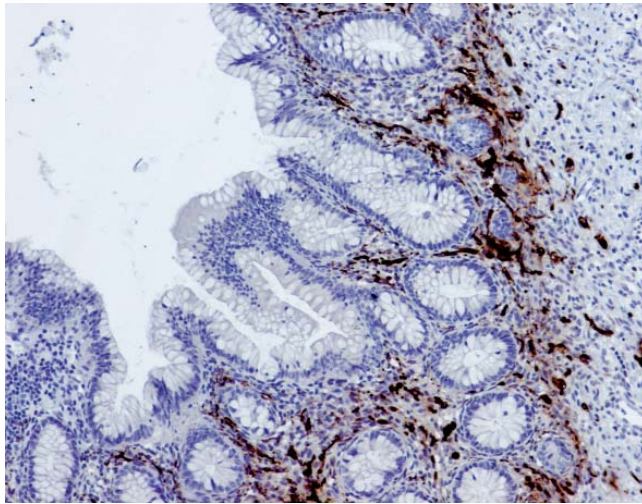
**Figura 9.** Células ganglionares inmaduras dispuestas en estructuras rosetoides; nótese que son pequeñas con núcleo excéntrico y citoplasma elongado gris-azulado. (H&E 200X).



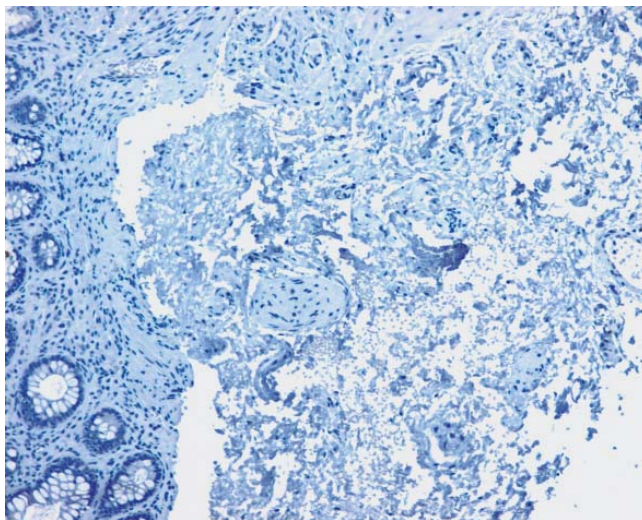
**Figura 10.** Inmunohistoquímica con S100, marcación equívoca y difícil de interpretar. (S100 400X).

Dentro de la gran variedad de marcadores del mercado, recomiendo especialmente la calretinina, una proteína ligadora de calcio involucrada en su vía de señalización y que juega un papel importante en la organización y funcionamiento del sistema nervioso central (13). Este marcador se considera una alternativa a la técnica de la acetilcolinesterasa (5, 8) ya que da un patrón positivo en pacientes que no sufren la enfermedad mientras que es negativa o muy débilmente positiva en casos de aganglioneosis (figuras 11 y 12). En los pacientes normales hay positividad en la muscular

de la mucosa, en la lámina propia y en el plexo submucoso donde tiñe las células de Schwann y resalta en forma muy fuerte los núcleos de las neuronas. En casos de aganglioni-  
 osis puede existir discreta positividad para calretinina en las fibras nerviosas pero se describe negatividad en la muscular de la mucosa, en lámina propia y por supuesto no hay positividad nuclear. De nuevo, en estos casos como en casi todos los estudios de patología, las técnicas de inmunohistoquímica deben interpretarse en conjunto con la hematoxilina y teniendo en cuenta los posibles falsos positivos/negativos.



**Figura 11.** Inmunohistoquímica con calretinina en paciente con inervación normal, marcación positiva en lámina propia, muscular de la mucosa y plexo de Meissner. (Calretinina 100X).



**Figura 12.** Inmunohistoquímica con calretinina en paciente con aganglioni-  
 osis. Marcación negativa en lámina propia, muscular de la mucosa y plexo de Meissner. (Calretinina 100X).

## CONCLUSIONES

La EH clásica se caracteriza histológicamente por tener filetes nerviosos gruesos, grandes (generalmente mayores de 40 micras de diámetro), compactos y, por supuesto, sin células ganglionares. El observar este cuadro histológico en un seriado de 100 cortes en promedio tiene suficiente especificidad para establecer el diagnóstico.

La presencia de filetes nerviosos escasos, pequeños o laxos, en ausencia de células ganglionares debe ser evaluada con cautela y es prudente sospechar otras enfermedades. Es importante recordar que esta imagen puede corresponder a los tipos infrecuentes de aganglioni-  
 osis (de segmento largo y total del colon) donde contrario a lo usual, puede verse una disminución o casi ausencia de plexos.

Las células ganglionares inmaduras tienen morfología diferente, se agregan en estructuras rosetoides y tienen mínima cantidad de neuropilo. Aprender a reconocerlas es de vital importancia pues el no interpretarlas correctamente puede llevar a diagnósticos errados de aganglioni-  
 osis.

La inmunohistoquímica con marcadores convencionales para neuronas como NSE y BCL2 son de utilidad cuando en un seriado existe duda de si las células observadas son neuronas inmaduras ya que su positividad confirmará el diagnóstico.

Si el laboratorio tiene acceso a la calretinina, este es un método simple y confiable para ayudar a establecer el diagnóstico de EH; se considera una alternativa a la técnica de la acetilcolinesterasa ya que da un patrón positivo en pacientes que no sufren la enfermedad, mientras que es negativa o muy débilmente positiva en casos de aganglioni-  
 osis.

Mi última recomendación es que no olvidemos la responsabilidad que tenemos los patólogos cuando confirmamos o descartamos una EH. La mortalidad de un megacolon agangliónico sin tratamiento en la infancia es tan alta como el 80%. La mortalidad en los casos tratados con cirugía es en general baja pero las complicaciones son muchas: estenosis o escurrimiento de la anastomosis, obstrucción intestinal, abscesos pélvicos o de la herida, incontinencia, enterocolitis, etc. Esto pone de manifiesto que es un error grave no diagnosticar la enfermedad pero que el panorama no es mejor cuando se establece un falso diagnóstico de EH ya que el paciente no solo va a ser sometido al riesgo de una cirugía que no le va a servir para su enfermedad sino que puede tener una serie de complicaciones por la intervención que le causa incluso la muerte.

## REFERENCIAS

1. Masi P, Miele E, Staiano A. Pediatric anorectal disorders. *Gastroenterol Clin North Am* 2008; 37: 709-730.



2. Khan AR, Vujanic GM, Huddart S. The constipated child: how likely is Hirschsprung's disease? *Pediatr Surg Int* 2003; 19: 439-442.
3. Montedónico S. Constipación crónica y desordenes de los plexos entéricos. *Rev Med Clin Condes* 2009; 20: 805-806.
4. López T. JC, Jaramillo B, LE. Papel o utilidad de la biopsia rectal en el estudio del paciente pediátrico con estreñimiento. Experiencia de cinco años en un centro de referencia colombiano 2011. Pendiente publicación.
5. De Lorigan F, Reitsma JB, Voskuil WP, Aronson DC, Ten FJ Kate, Smets AM, Taminiou JA, Benninga M. Diagnosis of Hirschsprung's Disease: A Prospective, Comparative Accuracy Study of Common Tests. *J Pediatr* 2005; 146: 787-92.
6. Meier-Ruge W, Bruder E, Kapur RP. Intestinal Neuronal Dysplasia Type B: One Giant Ganglion is Not Good Enough. *Pediatric and Developmental Pathology* 2006; 9: 444-452.
7. Feichter S., Meier-Ruge WA, Bruder E. The histopathology of gastrointestinal motility disorders in children. *Seminars in Pediatric Surgery* 2009; 18: 206-211.
8. Wakely PE Jr, McAdams AJ. Acetylcholinesterase histochemistry and the diagnosis of Hirschsprung's disease: a 3 1/2-year experience. *Pediatr Pathol* 1984; 2(1): 35-46.
9. Puri. Variant Hirschsprung's Disease. *Journal of Pediatric Surgery* 1997; 32(2): 149-157.
10. Qualman SJ, Jaffe R, Bove KE, Monforte-Muñoz H. Diagnosis of Hirschsprung Disease Using the Rectal Biopsy: Multi-institutional Survey. *Pediatric and Developmental Pathology*, 1999; 2: 588-596.
11. Ariel I, Vinograd I, Lernau OZ et al. Rectal mucosal biopsy in Aganglionosis and allied conditions. *Hum Pathol* 1983; 14: 991-995.
12. Venugopal S, Mancor K, Shandling B. The validity of rectal biopsy in relation to morphology and distribution of ganglion cells. *J Pediatric Surg* 1981; 16: 433-437.
13. Guinard-Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, et al. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease. *Modern Pathology* 2009; 22: 1379-1384.