

## ارزش تشخیصی رنگ آمیزی انولاز اختصاصی نرون در بیوپسی‌های رکتوم بیماران مشکوک به بیماری هیرشپرونک

ژیلا ترابی زاده (M.D.)<sup>+</sup> فرشاد نقش وار (M.D.)\* امید عمادیان (M.D.)\*  
علیرضا علم (M.D.)\*\* علیرضا خلیلیان (Ph.D.)\*\*\* ناعمه پیوندی (M.D.)\*\*\*\*

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری هیرشپرونک (HD) شایع‌ترین علت انسداد روده‌ای نوزادان می‌باشد. به دلیل مشکلات وعوارض بیوپسی تمام ضخامت وعضلات سروزی رکتوم، تمایل به انجام بیوپسی مخاطی- زیرمخاطی رکتوم می‌باشد. ولی تفسیر این بیوپسی‌ها با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین (H&E) و حتی رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC) متداول یعنی استیل کولین استراز دارای مشکلاتی می‌باشد. از آنجا که اطلاعات درباره صحت رنگ آمیزی انولاز اختصاصی نرون (NSE) برای تشخیص هیرشپرونک که مارکری دردسترس و قابل انجام بر روی بلوک‌های پارافینه می‌باشد، ناکافی است، این مطالعه با هدف تعیین ارزش تشخیصی NSE بر بیوپسی‌های مخاطی- زیرمخاطی رکتوم در تشخیص بیماری هیرشپرونک و اختلالات وابسته انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه بر 65 بیوپسی مخاطی زیرمخاطی و 65 بیوپسی عضلانی- سروزی (استاندارد) رکتوم بیماران مشکوک به بیماری هیرشپرونک و اختلالات وابسته مراجعه کننده به بیمارستان‌های بوعلی وشفای ساری (از فروردین 1382- مهر 1383) انجام شد. از هر بیمار یک بیوپسی مخاطی- زیرمخاطی و یک بیوپسی عضلانی- سروزی گرفته شد. لام‌های نمونه‌های مخاطی- زیرمخاطی با NSE و نمونه‌های عضلانی- سروزی با H & E رنگ آمیزی و به صورت دوسو کور خوانده و با هم مقایسه شد. داده‌ها با فرمول‌های حساسیت و ویژگی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** حساسیت، اختصاصیت، کارایی و ارزش اخباری مثبت و منفی رنگ آمیزی NSE در تشخیص بیماری هیرشپرونک به ترتیب 100 درصد، 84/2 درصد، 89/1 درصد، 81/8 درصد، 100 درصد بود. که اختلاف معنی دار از نظر آماری با استاندارد نشان داد. در بررسی 5 مورد هیپوگانگلیوزیس، رنگ آمیزی NSE در یک مورد منفی کاذب و در 9 مورد مثبت کاذب وجود داشت.

**استنتاج:** یافتن سلول گانگلیونی با رنگ آمیزی NSE قطعاً بیماری هیرشپرونک را رد می‌کند و عدم وجود سلول‌های گانگلیونی در 81/8 درصد موارد تشخیص HD را به درستی مطرح می‌کند. لذا استفاده از NSE در مواردی که نمونه یک بیوپسی مخاطی- زیرمخاطی باشد منطقی به نظر می‌رسد. این روش شاید در نشان دادن وجود یا عدم وجود سلول گانگلیونی کافی باشد ولی شمارش سلول گانگلیونی (که در تشخیص اختلالات وابسته لازم است) نیازمند بررسی شبکه عصبی میانتریک است.

**واژه‌های کلیدی:** هیرشپرونک، بیوپسی، رکتوم، انولاز اختصاصی نرون، ایمونو هیستوشیمی

E این تحقیق طی شماره 53-81 در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

\* متخصص پاتولوژی کلیتیکال و سرجیکال، عضو هیات علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران  
\*\* فوق تخصص جراحی اطفال، عضو هیات علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران  
+ \* ساری: خیابان امیرمازندرانی - مرکز آموزشی درمانی امام  
\*\*\* دکترای آمار، عضو هیات علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

\*\*\*\* دستیار پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

E تاریخ دریافت: 84/2/20 تاریخ تصویب: 84/5/26

## مقدمه

بیماری هیرشپروننگ یک اختلال مادرزادی (1) و شایع ترین علت انسداد روده نوزادان می باشد (2). تشخیص استاندارد آن براساس اثبات آگانگلیوزیس دریوپسی عضلانی - سروزی یا تمام ضخامت رکتوم می باشد و از اختلالات وابسته (هایپرگانگلیوزیس وهیوگانگلیوزیس) باید افتراق داده شود (3 و 4).

پس از آن که اثبات شد که سگمان آگانگلیونیک در بیماران مبتلا به بیماری هیرشپروننگ در دو ناحیه مخاطی - زیر مخاطی و بین عضلانی دیواره روده طول یکسانی دارد، تمایل زیادی به ارسال بیوپسی رکتال به صورت مخاطی - زیر مخاطی ایجاد شد. زیرا که برداشتن بیوپسی عضلانی نیاز به بیهوشی عمومی داشته، از نظر تکنیک جراحی مشکل بوده و عوارض خطرناکی مانند پرفوراسیون، اسکار، تنگی و خونریزی دارد. در حالی که بیوپسی مخاطی - زیر مخاطی را می توان با روش ساکشن رکتال بیوپسی به صورت سرپایی در مطب بدون عارضه قابل توجهی انجام داد (3 و 5). اما تفسیر یک بیوپسی مخاطی - زیرمخاطی بسیار دشوارتر از بیوپسی عضلانی - سروزی است. شبکه زیرمخاطی و سلول های گانگلیونی آن کوچک تر و با انتشار نامنظم تر از شبکه میانتریک می باشند. سلول های گانگلیونی در رنگ آمیزی روتین H&E قابل اشتباه با سلول های اندوتلیال، فیبروبلاست، هیستوسیت و لنفوسیت می باشند (3) رنگ آمیزی استیل کولین استراز اولین مارکر IHC به کار رفته بر بیوپسی مخاطی - زیرمخاطی رکتال (6) دارای مشکلاتی است از جمله آنکه تنها قابل انجام بر مقاطع تازه می باشد (نمونه تازه همیشه در دسترس نیست) و با خونریزی زیرمخاطی تفسیر آن مشکل می شود (5) و نیز دارای موارد منفی کاذب و مثبت کاذب است (7 و 8) علی رغم بررسی های وسیع بر مارکرهای ایمونوهیستوشیمی هنوز هم پاتولوژیست ها برسریک

مارکر توافق ندارند (9-13). گرچه NSE مورد توجه می باشد ولی نتایج تحقیقات در مورد آن ناکافی و تا حدی متناقض است و گزارش دقیقی از حساسیت و اختصاصیت آن در دست نیست.

نتایج مطالعه Vinore-SA، (14) Lampert, HALL، Frykberg و همکاران (15) و Machenzie و همکاران (16) اشاره به مفید بودن NSE در تشخیص بیمار هیرشپروننگ کرده است ولی گزارشی از ارزش تشخیصی آن ندادند است. در مطالعه Ana Margarida و همکاران (17) نیز روش NSE مزیت قابل توجهی بر H&E در زیرمخاط نداشته است. نتایج بررسی طالبی و همکاران با مطالعه بر بیوپسی رکتوم ارزش تشخیصی، را به ترتیب از کاتپسین D، CD56، NSE نشان داده است (12).

با توجه به ارزان، در دسترس و آسان بودن تکنیک، قابل انجام بودن بر بلوک های پارافینه و نشان دادن سلول گانگلیونی علاوه بر الیاف عصبی در رنگ آمیزی NSE طرف و عدم وجود اطلاعات کافی از ارزش تشخیصی، ارزش تشخیصی رنگ آمیزی NSE بر روی نمونه های بیماران مشکوک به هیرشپروننگ در بیمارستان های بوعلی سینا و شفا ساری بررسی می شود.

## مواد و روش ها

این مطالعه به صورت آینده نگر روی نمونه های بیوپسی رکتال مخاطی - زیرمخاطی 67 بیمار مشکوک به بیماری هیرشپروننگ و اختلالات وابسته (از فروردین 82 تا مهر 83) که به بیمارستان های بوعلی و شفا ساری مراجعه کرده بودند انجام گرفت. در همه بیماران مشکوک به هیرشپروننگ، توسط پزشک فوق تخصص جراحی اطفال 2 نمونه بیوپسی (یکی مخاطی زیرمخاطی

## یافته‌ها

از 67 نمونه ارسالی 2 مورد به دلیل ناکافی بودن ناحیه زیرمخاطی حذف شد. از 65 نمونه، 47 مذکر و 18 مونث با دامنه سنی یک‌روز تا 10 سال، میانگین سنی 1/7 سال، میانه سنی 60 روز بود.

علت مراجعه 63 بیمار، بیوست و 2 بیمار مقعد سوراخ نشده داشتند.

بررسی میکروسکوپی 65 مورد بیوپسی عضلانی - سروزی رکتوم که با روش H × E رنگ آمیزی شده بود (استاندارد طلایی) نشان داد که، 27 مورد سلول گانگلیونی نداشته و 38 مورد سلول گانگلیونی داشتند از 38 مورد، 33 مورد نرمال و 5 مورد هیپوگانگلیوزیس و در هیچ مورد هایپرگانگلیوزیس وجود نداشت.

بررسی میکروسکوپی بیوپسی‌های مخاطی - زیر مخاطی رکتوم بیماران که با روش NSE رنگ آمیزی شده بود نشان داد که، 33 مورد سلول گانگلیونی نداشته و 32 مورد سلول گانگلیونی داشتند. در مقایسه مورد به مورد با استاندارد، مثبت کاذب 6 مورد و هیچ منفی کاذبی وجود نداشت.

جدول شماره 1 نتایج ارزش تشخیصی NSE در بیوپسی‌های مخاطی - زیر مخاطی رکتوم در را نشان می‌دهد.

جدول شماره 1: نتایج ارزش تشخیصی NSE در بیوپسی‌های مخاطی - زیر مخاطی رکتوم بیماران مشکوک به هیرشروننگ

ویژگی	84/2%
حساسیت	100%
ارزش اخباری مثبت (PPV)	81/8%
ارزش اخباری منفی (PPV)	100%
کارایی	89/1%
Pvalue	<0/05

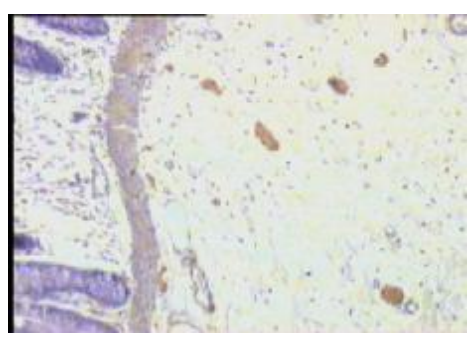
و دیگری تمام ضخامت یا عضلانی - سروزی) از 2cm یا بیشتر بالای anal valve برداشته شد. کلیه نمونه‌ها در محلول فرمالین 10 درصد گذاشته شد و به مدت 12-18 ساعت فیکس شده و بعد از طی مراحل لازم، بلوک‌های پارافینی تهیه شد. سپس از نمونه‌ها مقاطع 4 تهیه شده و 5 تا 10 مقطع از بیوپسی عضلانی با روش H&E و دو مقطع از هر نمونه مخاطی - زیرمخاطی با روش NSE (Poly clonal Rabbit Anti-NSE) (طبق دستور کارخانه سازنده DAKO) رنگ آمیزی گردید. اسلایدها به صورت دوسوکور از نظر وجود یا عدم وجود سلول گانگلیونی و در صورت وجود سلول گانگلیونی از نظر تعداد بررسی و نتایج نمونه های مخاطی زیر مخاطی با نمونه های عضلانی (استاندارد) مقایسه شد. و در پایان با فرمول‌های حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و منفی و کارایی، محاسبات لازم انجام شد و با فرمول MCNemal و جدول X Pvalue محاسبه گردید.

کرایتریای تشخیص هیستوپاتولوژیک:

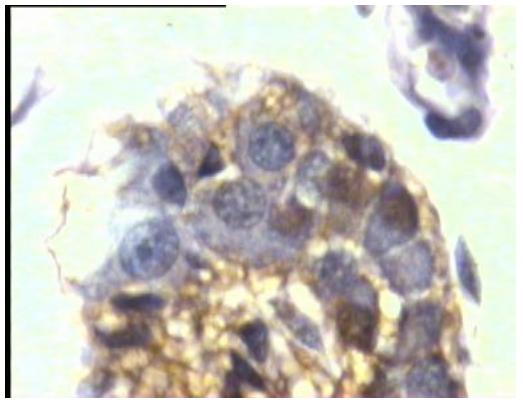
- بیماری هیرشروننگ: فقدان سلول گانگلیونی در شبکه عصبی (1)  
 - هیپوگانگلیوزیس: حضور اندک (2-1) سلول گانگلیونی در هر شبکه عصبی یا گانگلیای اینترامورال (10.17).

- دیسپلازی عصبی روده (IND): وجود گانگلیای عصبی هایپر تروفیک حاوی تعداد نرمال (3-5) یا افزایش یافته سلول گانگلیونی بزرگ (پریکاریون بزرگ با هسته بیزار)، گاهاً وجود سلول گانگلیونی به صورت ایزوله در ناحیه زیرمخاط (1.17.19).

موقعیت سلول گانگلیونی در شبکه عصبی و آشنایی و توجه به سیتولوژی آن سبب می گردد که این سلولها با هیچ سلول دیگری اشتباه نشوند. در این مطالعه نیز در بررسی 27 مورد مبتلا به بیماری هیرشپروننگ هیچ منفی کاذبی نداشته و حساسیت این مارکر در تشخیص بیماری هیرشپروننگ 100 درصد بود.



شکل شماره 1: بیوپسی مخاطی - زیر مخاطی رکتوم نرمال از شیرخوار 37 روزه - شبکه های عصبی مایسنر متعدد برنگ قهوه ای با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی NSE به خوبی دیده می شوند. بزرگ نمایی



نتایج نشان داد که تفاوت این تست با استاندارد از نظر آماری معنی دار بوده و قدرت تشخیص دوروش تفاوت دارد.

بررسی میکروسکوپی نمونه های دارای سلول گانگلیونی از نظر تعداد سلول گانگلیونی با رنگ آمیزی NSE نشان داد که 19 مورد نرمال و 13 مورد هیپوگانگلیوزیس بود. 33 نمونه که در روش استاندارد، نرمال گزارش شده بود، ریوپسی های مخاطی - زیرمخاطی و با روش NSE ، 19 مورد نرمال ، 9 مورد هیپوگانگلیوزیس، 5 مورد هیرشپروننگ تشخیص داده شد.

5 مورد که در روش استاندارد، هیپوگانگلیوزیس گزارش شد، در بیوپسی های مخاطی - زیرمخاطی و با روش NSE ، 4 مورد هیپوگانگلیوزیس و 11 مورد هیرشپروننگ تشخیص داده شد.

**بحث**

تاکنون تنها چند مارکر IHC جهت مشخص کردن سلول های گانگلیونی گزارش شده است (18 و 1) و NSE از جمله این مارکرها می باشد. (جهت رد HD، مشاهده GC ضروری می باشد تا تشخیصی بر اساس تعریف بیماری ارائه شود).

در بررسی بیوپسی های مخاطی - زیرمخاطی با NSE، شبکه عصبی به رنگ قهوه ای در یک زمینه بی رنگ دیده می شود و یافتن آن حتی در درشت نمایی پایین به راحتی امکان پذیر است و لذا یافتن سلول های گانگلیونی تسهیل می شود. سیتوپلاسم سلول های گانگلیونی قهوه ای شده و هسته سلول شوان رنگ نمی گیرد. (شکل شماره 1 و 2) ممکن است سلول های التهابی راکسیون ضعیفی نشان دهند ولی توجه به

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 0:31 +0430 on Thursday April 25th 2019

(1383) بر 47 نمونه بیوپسی رکتوم و 10 مارکر مختلف برهرنمونه نشان داد که ارزش تشخیصی هرمارکر براساس کیفیت رنگ آمیزی و قدرت تمایز آنها به ترتیب مربوط به کاتپسین D و CD56 و NSE می باشد. (12).

در این مطالعه نتایج بررسی موارد نرمال و هیپوگانگلیوزیس (موارد دارای سلول گانگلیونی) در بیوپسی های مخاطی - زیر مخاطی رنگ آمیزی شده با NSE با یافته های استاندارد مطابقت نداشت. به نظر می رسد علت این عدم تطابق تعداد کمتر سلول های گانگلیونی در ناحیه زیر مخاطی در مقایسه با ناحیه بین عضلانی باشد. لذا تشخیص موارد نرمال و هیپوگانگلیوزیس در بیوپسی های مخاطی - زیر مخاطی با استفاده از کرایترهای مورد استفاده در ناحیه بین عضلانی دچار اشکال می شود. این مشکل نه تنها در صورت استفاده از NSE، بلکه در صورت استفاده از هر مارکری که سلول گانگلیونی را نشان می دهد بروز می کند این در حالی است که در منابع موجود، کرایتریای مجزایی جهت تشخیص این موارد در زیرمخاط وجود ندارد و نیز Ana Margarida (17) با همین کرایتریای تشخیصی، اقدام به تشخیص نمودند. شاید لازم باشد جهت رفع این مشکلات با تحقیق بیش تر کرایتریای جدیدی در ناحیه زیرمخاط جهت تشخیص موارد نرمال و اختلالات وابسته ارائه شود.

در این مطالعه از مجموع 5 مورد هیپوگانگلیوزیس 4 مورد به درستی با NSE تشخیص داده شد. البته به دلیل تعداد کم این موارد، نمی توان نتایج را قاطعانه به نمونه های، بیش تر تعمیم داد. هم چنین در این مطالعه هیچ مورد هایپرگانگلیوزیس وجود نداشت اصولاً کرایتریای تشخیصی و حتی وجود آن مورد بحث است و بسیاری معتقدند که این تشخیص را باید برای موارد با پاتولوژی چشمگیر گذاشت (19).

شکل شماره 2: بیوپسی ذکر شده در شکل 1 - یک شبکه عصبی مایسز با سلول های گانگلیونی متعدد در بزرگنمایی بیش تر دیده می شود. سلول های گانگلیونی واکنش سیتوپلاسمی مثبت با رنگ آمیزی NSE نشان می دهند.  $\times 1000$

در مطالعه Anna.Athow و همکاران در لندن (1987 تا 1980) بر روی 60 بیمار مشکوک به هیرشپروننگ و بر بیوپسی های مخاطی - زیرمخاطی با استیل کولین استراز، منفی کاذب 44 درصد و مثبت کاذب 2 مورد گزارش شد (7). 44 درصد منفی کاذب در مقایسه با نداشتن منفی کاذب در روش NSE پایه های تشخیصی را در استفاده از استیل کولین استراز تا حدی سست می کند.

در این مطالعه 6 نمونه مثبت کاذب گزارش شد که می تواند ناشی از توزیع هتروژنوس NSE در سلول های گانگلیونی و به خصوص سلول های گانگلیونی نابالغ باشد. تجزیه و تحلیل آماری نشان گر اختلاف آماری معنی دار این تست با استاندارد بود. بنابراین ارزش اخباری منفی معادل 100 درصد بسیار ارزشمند است و بایک بیوپسی کم عارضه مخاطی زیر مخاطی رکتوم قطعاً می توان HD را کنار گذاشت.

نتایج بررسی HAL و همکاران در آمریکا (1985) بر روی 27 نمونه بیوپسی رکتال زیرمخاطی کودکان مشکوک به بیماری هیرشپروننگ با استفاده از NSE و S 100 نشان داد، این تکنیک ها شناسایی اشکال نابالغ و کوچک سلول گانگلیونی را تسهیل می کند (14) ولی جهت تعمیم این نتایج به نظری رسد لازم باشد مطالعه بر تعداد بیش تری نمونه انجام گیرد.

نتایج sternberg (2004) نیز نشان داد که در انجام تست های ایمونوهیستوشیمی NSE بر مقاطع بافتی موفق بودند (19) هم چنین بررسی طالبی و همکاران در اصفهان

Vinore-SA و همکاران (1985) با استفاده از NSE

بر بیوپسی رکتال زیرمخاطی و نیز نمونه های جراحی نتیجه گرفتند NSE تشخیص موارد هیپوگانگلیونیک را از آگانگلیونیک تسهیل می کند (13) به نظر می رسد جهت تعمیم نتیجه گیری لازم است کلیه نمونه های انتخابی بیوپسی مخاطی = زیرمخاطی باشد.

نتایج نشان می دهد یافتن سلول گانگلیونی در روش NSE قطعا تشخیص هیرشپروننگ را رد می کند و عدم وجود سلول گانگلیونی در 81/8 درصد موارد تشخیص را به درستی مطرح می کند، لذا استفاده از NSE در مواردی که نمونه در دسترس جهت تفسیر یک بیوپسی مخاطی - زیرمخاطی رکتال می باشد جهت رد بیماری هیرشپروننگ منطقی به نظر می رسد. NSE با حساسیت بالا در کنار یک مارکر با اختصاصیت بالاتر (در آینده) می تواند به صورت پانل تشخیصی به کار رود. به نظر

### فهرست منابع

1. Rosi. Juan. *Ackerman s, surgical Pathology*, 9<sup>th</sup> Edition, USA: mosby – Year book Inc. 2004, 777-779
2. Behrman E. Richard, kliegman M. Robert, Jenson B. Hal, *Nelson test book of pediatrics*, 16<sup>th</sup> Edition .u.k: wB. Saunders, 2000, 1139-1141
3. Stocker J. Thomas, Dehner louis P. *Pediatric pathology*, Lippincott Williams and wilkins, second Edition ,2001, 649-653.
4. Hyams, wyllie, *Pediatric Gastro intestinal Disease, second Edition*, WB/ saunders, 1999, 489-498.
5. O Neill james A., Rowe Marcl , Grosfeld Jayl, *Pediatric surgery*, Fifth Edition, 1999, 1390-1396.
6. Meier Ruge w, lutter beck PM, Herzog B, Morger R, Moset R, Scharli AF. Acetylcholin esterase activity in suction biopsy of rectum in the diagnosis of Hirschsprung s disease, *J Pediatric surg*, 1972; 7:11-17.
7. Athow AC, filipe MI, Drake DP. Problems and advantages of acetylcholin esterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung s disease *,J-pediatr –surg* 1999 May; 25(5): 220-9.
8. Novak N, Peiffer J, Acetyl cholinesterase negativity in the lamina propria in the First 8 weeks of life dose not exclude *Hirschsprung s diseas, z-kinderchir*, 1989 Feb; 44(1): 33-6.

می رسد وجود این مارکر در زیر مخاط، جهت نشان دادن وجود یا عدم وجود سلول گانگلیونی کافی باشد ولی شمارش سلول گانگلیونی کافی نیازمند شبکه عصبی میانتریک است.

### سپاسگزاری

از زحمات آقای دکتر شهریار شفائی، متخصص کلینیکال و آناتومیکال پاتولوژی، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل که در امر رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی همکاری داشته اند قدردانی می شود.

9. Koteeswaran Rajasekaran, Gop Alan Rama, Hirschsprung s Disease Immunohistochemical markers using S<sub>100</sub> and cathepsin D as a potential aid to diagnosis, 2002; 23: 11:1-16.
10. Miyasaki E, Ohshiro K, Puri P, NADPH – diaphorase histochemical staining of suction rectal biopsies in the diagnosis of Hirschsprung s disease and allied disorders, *pediatr-surg – INT*, 1998 sep; 13(4): 464-7.
11. Petchasuwan C, Pintong J, Immunohistochemistry for intestinal ganglion cells and nerve fibers, aid in the diagnosis of Hirschsprung s disease, *J-Med, Assoc -Thai*, 2000 Nov; 83(11): 1402-9.
12. طالبی. اردشیر، عدالتی. مسعود، معمارزاده. مهرداد، وحیدی. نسرین، انتخاب بهترین پانل تشخیصی از مارکرهای ایمونو هیستوشیمی برای تعیین سلول گانگلیونی در بیماری هیرشپرونک، همایش آسیب شناسی ایران، تهران، 1383.
13. Vinores SA, May E, Neuron specific enolase as an immuno histochemical tool for the diagnosis of Hirschsprung s disease , *AM – J surg –Pathol* 1985 Apr; 9(4): 281-5.
14. Hall CH, Lampert PW, Immunohistochemistry as an aid in the diagnosis of Hirschsprung s disease , *J Neuropathol- EXP Neurol*, 1984; 43: 311.
15. Frykberg T, Esscher T, Pahlman S, Olsson Y, Neuron- specific enolase as a marker for intestinal neurons. An immunocyto chemical study of the human intestinal tract, *Acta- Neuropathol, Berl*, 1985; 66(3): 184-7.
16. Mackenzie JM, Dixon MF. An immunohistochemical study of the enteric neural plexi in Hirschsprung s disease, *Histopathology*, 1987; 11(10): 1055-66.
17. Ana-Margarida, Barbosa- AJ, Carvalho- AA, pinheiro-FC, Coelho-M, cabral- MM, usefulness of immuno cyto chemical demonstration of neuron-specific enolase in the diagnosis of Hirschsprung s diseases, *J-Pediatr- Gastro enterol-Nutr*, Nov 1990; 11(4): 496-502.
18. Matthias J. szabolcs. M.D, James visser, JD, Michael shelanski M.D, Peripherin a novel marker for the immunohistochemical study of-malformation of enteric nerveus system. *pediatric pathology and labratory medicine* 16,1996,51-70.
19. Christopher L., HALL, M.D, PETER W. Lampert MD, Immunohistochemistry as an aid in the diagnosis of Hirschsprung s disease. *Am-J, clin pathol*, feb 1985; 83(2): 177-81.
20. Sternberg Stephans, Antonioli Donald A., cater Darryl, Mills Stacey E. aberman Harold A., *Diagnostic surgical pathology, 4<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams and wilkins*, 2004,139.