

Aus der Klinik für Kinderchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Differenzierung von unkomplizierter
und komplizierter Appendizitis im Kindesalter –
Von der Analyse der Routinediagnostik zur Überprüfung
von Computer-Algorithmen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Maximiliane I. Minderjahn
aus Berlin

Datum der Promotion: 18.12.2020

Für meine Schwestern,
weil sie das Licht in mein Leben bringen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VI
Abstract	VIII
1 Einleitung	9
1.1 Akute Appendizitis	9
1.1.1 Epidemiologie.....	9
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	9
1.1.3 Diagnostik	12
1.1.4 Therapie.....	15
1.2 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Patientendaten	18
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Studie I.....	19
2.2.2 Studie II.....	20
2.2.3 Studie III.....	21
2.2.4 Studie IV.....	22
2.3 Statistik	23
2.3.1 Studie I und II.....	23
2.3.2 Studie III.....	24
2.3.3 Studie IV.....	24
2.4 Wissenschaftliche Praxis.....	25
2.5 Ethik.....	25
3 Ergebnisse	26

3.1	Studie I	26
3.2	Studie II	28
3.3	Studie III	29
3.4	Studie IV.....	31
4	Diskussion.....	32
4.1	Limitationen	37
4.1.1	Studie I und II.....	37
4.1.2	Studie III.....	37
4.1.3	Studie IV.....	37
4.2	Ausblick	38
4.2.1	Genexpressionsanalyse.....	38
4.2.2	Standardisierung der Ultraschalldiagnostik.....	39
5	Literaturverzeichnis.....	40
6	Publikationen.....	46
6.1	Studie I:	46
6.2	Studie II:	52
6.3	Studie III	59
6.4	Studie IV	67
	Eidesstattliche Versicherung.....	LXXVIII
	Anteilserklärung an den ausgewählten Publikationen.....	LXXIX
	Lebenslauf	LXXXI
	Vollständige Publikationsliste	LXXXII
	Danksagung.....	LXXXIV

Abkürzungsverzeichnis

AA	Akute Appendizitis
ACA	Akute komplizierte Appendizitis
AUA	Akute unkomplizierte Appendizitis
AUC	Fläche unter der Kurve (area under Curve)
CD8+	Cluster of differentiation 8 (positive)
CI	Konfidenzintervall
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
gg	Gangränöse Gruppe
ICD	International Classification of Diseases
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
KI	Künstliche Intelligenz
LA	Laparoskopische Appendektomie
LBFGS	Limited-Memory Broyden-Fletcher–Goldfarb-Shanno Verfahren
ML	Maschinelles Lernen
OR	Odds Ratio, Chancenverhältnis
PD-L1	Programmed death-Ligand 1
ph	Phlegmonöse Gruppe
pf	Perforierende Gruppe
ROC	Receiver operator characteristic
SILS	Single-incision laparoscopic surgery
Th	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen

Zusammenfassung

Einführung: Die Unterscheidung zwischen komplizierter und unkomplizierter Appendizitis ist hinsichtlich der Patientenstratifizierung verschiedener therapeutischer Möglichkeiten entscheidend.

Es wurde zunächst untersucht inwieweit Parameter im Rahmen der Routinediagnostik aus Labor und Sonografie für die Unterscheidung der Entitäten genutzt werden können. Anschließend wurden die Werte mittels künstlicher Intelligenz (KI) in einem Mehr-Parameter-Modell kombiniert und anschließend validiert.

Material und Methoden: Die Daten appendektomierter Patienten wurden hinsichtlich epidemiologischer Parameter, zeitlicher Verläufe, histopathologischer Beurteilung, der Differentialblutbilder, der CRP-Werte und sonografischer Parameter ausgewertet. Das Signifikanzniveau lag bei $p > 0.01$. Die erhobenen Parameter wurden mit Algorithmen aus dem maschinellen Lernen und der KI analysiert. Die resultierenden Biomarker-Signaturen wurden in einem Validation-Modell getestet.

Ergebnisse: Die Auswertung der Laborwerte über die Zeit ergab insbesondere für CRP und Leukozyten ein signifikant differenziertes Bild. Die phlegmonöse Entzündung war durch eine zeitlich stabile Eosinophilie gekennzeichnet ($p < 0.01$). Eine Analyse mittels Receiver-Operating-Characteristic-Kurve zeigte in Bezug auf alle Laborparameter eine grundsätzliche Unterscheidbarkeit; klinisch sinnvolle Cut-off-Werte ließen sich jedoch nicht festlegen. Sonografisch zeigte der Appendixdurchmesser von $>6\text{mm}$ eine Sensitivität von 98% für die Differenzierung der komplizierten Appendizitis, während das Vorhandensein eines Appendikolithen mit einer Spezifität von 98% assoziiert war. Hinweisgebend war insbesondere die Einschätzung des Kinderradiologen, ob eine Perforation vorlag ($p < 0.001$). Die Treffsicherheit der Biomarker-Signatur für die Diagnose einer Appendizitis betrug 90% (93% Sensitivität, 67% Spezifität), während die sie für die korrekte Erkennung einer komplizierten Entzündung 70% betrug (76% Sensitivität, 67% Spezifität). Unsere Biomarker-Signaturen übertrafen damit die Vorhersagewerte für einzelne Laborwerte.

Schlussfolgerung: In der Analyse der Laborparameter weist darauf hin, dass unkomplizierte und komplizierte Appendizitis unabhängige pathophysiologische Entitäten

darstellen, auch wenn sich die Parameter klinisch nicht zur Unterscheidung eignen. Die Sonographie hingegen hat einen großen klinischen Nutzen bei der Unterscheidung der Entitäten. Durch die Verwendung von Künstlicher Intelligenz in der Diagnostik der AA ließen sich in unserem Modell 1/3 aller Negativ-Appendektomien vermeiden.

Abstract

Introduction: Distinguishing phlegmonous and complicated appendicitis might be relevant due to current attempts to treat both forms of the disease differently.

Studies were performed to evaluate distinguishability of uncomplicated and complicated appendicitis using laboratory values and routinely performed ultrasound diagnostics. All parameters were analyzed using artificial intelligence.

Materials and Methods: Data of patients who underwent appendectomy were retrospectively reviewed regarding epidemiology, timeline (onset of symptoms – admission), histopathology, full blood counts and CRP values as well as predefined parameters. Level of significance was defined as $p < 0.01$. We used modern algorithms from machine learning and artificial intelligence to construct Biomarker-signatures, that were tested on validation sets.

Results: Analysis of full blood count showed a significantly differing picture with respect to CRP and leucocytes over time. Phlegmonous appendicitis was characterized by continuous relative eosinophilia ($p < 0.01$). ROC-Curve-Analysis showed means to differentiate entities through laboratory data, yet we could not show clinically reasonable cut-off values. Regarding differentiation by ultrasound diagnostics we were able to show a 98% sensitivity for appendix diameter $>6\text{mm}$ for complicated appendicitis, detection of appendicoliths was associated with a specificity of 98%. The assessment of the examining radiologist concerning perforation was highly significant with complicated appendicitis ($p < 0.001$). The biomarker signatures outperformed the conventionally used routine diagnostic parameters alone with an accuracy of 90% (93% sensitivity, 67% specificity). Accuracy for distinguishing complicated from uncomplicated appendicitis was 70% (76% sensitivity, 67% specificity).

Conclusion: Analysis of laboratory values indicates that uncomplicated and complicated appendicitis indeed rely on differing inflammatory patterns, though practical benefit is still limited. Ultrasound has proven beneficial in differentiation of these entities. The use of artificial intelligence to distinguish between entities of acute appendicitis could prevent up to a third of unnecessary appendectomies in our model.

1 Einleitung

1.1 Akute Appendizitis

1.1.1 Epidemiologie

Die akute Appendizitis (AA) stellt in industrialisierten Ländern die Hauptursache für das Vorliegen eines akuten Abdomens dar und ist nach wie vor die häufigste Indikation für eine chirurgische Notfall-Intervention im Kindesalter. Kinder aller Altersgruppen sind betroffen, der Manifestationsgipfel liegt in der frühen Adoleszenz (Andersson et al., 1994). Männer sind ganz allgemein häufiger betroffen und erkranken früher mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 10. und 14. Lebensjahr, während der Gipfel für die weibliche Population zwischen dem 15. und 19. Lebensjahr liegt (Addiss et al., 1990, Ohmann et al., 2002). Das Lebenszeitrisiko an einer AA zu erkranken beträgt in Europa und Nordamerika ca. 7-9%.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Auch wenn die AA eines der häufigsten Krankheitsbilder in der Chirurgie darstellt, ist die Ätiologie noch weitgehend ungeklärt. Neuere Theorien vermuten einen Zusammenhang zwischen genetischen, umweltbedingten und infektiösen (bakterielle, virale und parasitäre) Ursachen und der Entwicklung einer Appendizitis (Lamps, 2010, Wei et al., 2012). Die Abhängigkeit von der Jahreszeit, Hygiene, ethnischer Zugehörigkeit und geografischer Varianz sind nur einige Beispiele für aktuell diskutierte Risikofaktoren (Ohmann et al., 2002, Sadr Azodi et al., 2009).

In den vergangenen Jahren erschienen diverse Studien, welche die zwangsläufige Progredienz der AA in Frage stellen und stattdessen die Hypothese verschiedener Entitäten postulieren (Andersson et al., 1994, Kim et al., 2014, Ruber et al., 2010, Ruber et al., 2006, Svensson et al., 2015). So zeigten sich in einer schwedischen retrospektiven Studie für die perforierende Appendizitis epidemiologisch stabile Verhältnisse hinsichtlich Patientenalter, Beobachtungszeitraum (18 Jahre) und Laparotomie-Rate, während die Diagnose der nicht perforierenden Appendizitiden altersabhängig, über den

Beobachtungszeitraum abnehmend und des Weiteren von den diagnostischen Methoden abhängig war (Andersson et al., 1994). Andersson formulierte mit dieser Studie die Vermutung, die perforierenden und nicht-perforierenden Appendizitiden seien nicht nur unterschiedliche Stadien derselben Erkrankung, sondern eigenständige Entitäten, die von unterschiedlichen Einflussfaktoren gesteuert werden. Weitere Erkenntnisse sprechen für eine Entwicklung der komplizierten Appendizitis bereits vor der Perforation der Appendix. So zeigten sich in Untersuchungen der Pathogenese der Appendizitis unterschiedliche immunregulatorische Mechanismen für phlegmonöse und gangränöse Entzündungen, die fundamental unabhängige Entitäten nahelegen (Rivera-Chavez et al., 2004, Romano et al., 2014, Ruber et al., 2010, Ruber et al., 2006).

Zentral in unserer Studie ist daher die Kategorisierung der gangränösen Entzündung als *komplizierte* Appendizitis. Diese Definition ist auch aus klinischer Sicht gerechtfertigt, da die gangränöse Entzündung bereits vor dem Auftreten von Perforationen mit einer deutlich erhöhten Wahrscheinlichkeit für Komplikationen wie der Ausbildung intraabdominaler Abszesse einhergeht (Romano et al., 2014). Die gangränösen und perforierenden Entitäten werden in der vorliegenden Arbeit aus den genannten Gründen unter dem Begriff der *komplizierten Appendizitis* (ACA) zusammengefasst. Die aller Wahrscheinlichkeit nach unabhängige phlegmonöse Appendizitis hingegen geht mit einem unkomplizierten klinischen Verlauf einher, daher wird diese Form als *unkomplizierte Appendizitis* (AUA) bezeichnet.

Diese Hypothese unabhängiger Entitäten stellt das traditionelle chirurgische Verständnis eines voranschreitenden Prozesses von phlegmonöser Entzündung bis zur Perforation, der nur durch rechtzeitige chirurgische Intervention durchbrochen werden kann, in Frage. Das diagnostische und therapeutische Vorgehen wird durch diese Hypothese maßgeblich beeinflusst.

Aus den oben genannten Gründen gehen wir davon aus, dass die histopathologischen Befunde direkt mit den klinischen Befunden und insbesondere mit der Wahrscheinlichkeit für komplizierte Verläufe korrelieren. Daher verwenden wir die histopathologischen Kriterien als zentrale Unterscheidungsmerkmale für die untersuchten Patientengruppen. Mehrere Studien verwenden ähnliche Einteilungen (Fallon et al., 2013a, Fallon et al., 2013b, Fallon et al., 2015, St Peter et al., 2008).

Eine genetische Prädisposition wurde bereits in mehreren epidemiologischen Studien nahegelegt (Andersson et al., 1994). 2001 publizierten Gauderer et al. eine Studie,

welche darlegte, dass Kinder, die an einer akuten Appendizitis litten, eine dreifach erhöhte Wahrscheinlichkeit einer positiven Familienanamnese gegenüber Kindern gleichen Alters aus der Kontrollgruppe ohne Zeichen einer akuten Appendizitis hatten (Gauderer et al., 2001). Eine weitere Studie zeigte zudem, dass Kinder ein deutlich höheres Risiko haben an einer akuten Appendizitis zu erkranken, wenn bereits mindestens ein Verwandter ersten Grades eine Appendizitis durchgemacht hatte (Basta et al., 1990).

Überdies korreliert der Schweregrad der Appendizitis mit einem Polymorphismus des Interleukin-6 (IL-6) Gens, was wiederum auf eine genetisch determinierte unterschiedliche Aktivierung des Immunsystems zwischen phlegmonösen und gangränösen Appendizitiden schließen lässt (Rivera-Chavez et al., 2004).

Die Beobachtung einer reziproken Beziehung der Inzidenz von AA und Colitis Ulcerosa und einer positiven Assoziation von AA und Morbus Crohn, sowie die signifikant geringere Inzidenz der AA während der Schwangerschaft spricht für eine immunologisch bestimmte Pathogenese, da all diese Zustände auf unterschiedlicher Aktivierung des Immunsystems bauen (Andersson and Lambe, 2001, Andersson et al., 2001, Andersson et al., 2003). Anders als bei der Annahme einer voranschreitenden Erkrankung scheint bei der Entwicklung verschiedener Formen der Appendizitis kein quantitativer, sondern ein qualitativer Unterschied in der Immunregulation zu bestehen.

Die zellvermittelte Immunität des menschlichen Immunsystems wird durch T-Helfer-Zellen (Th) vermittelt, die gegen intrazelluläre Mikroben schützen. Die Th-Zellen werden hinsichtlich ihrer Zytokinprofile unter anderem in Th1- und Th2-Zellen unterteilt. Die Zytokine der Th1 gesteuerten Immunantwort triggern eine zellvermittelte Immunantwort und das retikulohistiozytäre System, natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen. (Bonilla and Oettgen, 2010) Th2-abhängige Zytokine bewirken hingegen vor allem eine gesteigerte Antikörperproduktion, insbesondere der Isotypen IgE und IgG4, die eine tragende Rolle in der Hypersensibilität und parasitären Immunabwehr spielen. Zudem schütten Th2-Zellen IL-5 aus, welches nachweislich chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten wirkt, sowie die Produktion und Freisetzung von eosinophilen Granulozyten aus dem Knochenmark stimuliert (Akdis et al., 2011, Commins et al., 2010).

Th1 und Th2 folgen nachweislich dem Prinzip von Ying und Yang, die Regulation beider Systeme wird durch Th3 oder Treg-Zellen übernommen. Die vierte Gruppe der Th-Zellen, Th17, zeichnet sich insbesondere durch die Sekretion von IL-17 aus (Ruber et al., 2010).

IL-17 dient als stark wirksames proinflammatorisches Zytokin mit pleiotroper Aktivität. Zum einen aktiviert es proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- α , Chemokine und Matrixmetalloproteasen, die eine Gewebeeinfiltration und -zerstörung vermitteln. Zum anderen vermitteln Th17-abhängige Zytokine eine Zellrekrutierung, Aktivierung und verlängertes Überleben von neutrophilen Granulozyten im Inflammationsgeschehen.

1.1.3 Diagnostik

Trotz einer Inzidenz von mittlerweile mehr als 100 auf 100.000 Einwohner pro Jahr in den Industrieländern, ist die Diagnostik der akuten Appendizitis nach wie vor eine Herausforderung. (Ohmann et al., 2002) Grundsätzlich stehen zwei Aspekte der Diagnosestellung beim Verdacht einer akuten Appendizitis im Vordergrund: die Notwendigkeit alle tatsächlich entzündeten Fälle zu entdecken, um mögliche Verzögerung einer nötigen Intervention zu vermeiden, und alle komplizierten Fälle zeitnah sicher zu identifizieren. Auf der anderen Seite gilt es jedoch die Negativ-Appendektomie-Rate so gering wie möglich zu halten, um Kinder keinem unnötigen Risiko oder Komplikationen auszusetzen.

1.1.3.1 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung und eine gründliche Anamnese stehen am Anfang des diagnostischen Prozesses (Lee et al., 2001). Meist beginnt der klinische Verlauf mit unspezifischen epigastrischen Schmerzen, die sich nach einiger Zeit in den rechten Unterbauch verlagern und dann persistieren (Humes and Simpson, 2006). Das Leitsymptom der akuten Appendizitis ist der rechtsseitige Unterbauchschmerz. In der klinischen Untersuchung finden sich häufig neben der Druckschmerzhaftigkeit im rechten unteren Quadranten (McBurney-/Lanz-Druckpunkt) ein kontralateraler Loslassschmerz (Blumberg-Zeichen) oder der sogenannte Psoas-Dehnungsschmerz als Zeichen einer Mitbeteiligung des Peritoneums (von Schweinitz and Ure, 2009). Bei einer Perforation kommt es zudem häufig zum sogenannten schmerzfreien Intervall als Reaktion auf die Druckentlastung der afferenten Schmerzfasern in der Wand der Appendix gefolgt von persistierenden peritonitischen Schmerzen (Bundy et al., 2007, Humes and Simpson, 2006, von Schweinitz and Ure, 2009). Begleitsymptome sind unspezifisch und umfassen unter anderem: Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö oder Stuhlverhalt und Inappetenz. Vor allem Kinder präsentieren regelmäßig atypische Verläufe und gänzlich unspezifische

Symptomatik (Sivit et al., 2001). Klassische Symptome und pathognomonische Zeichen sind in weniger als 50% der pädiatrischen Patienten festzustellen (Bundy et al., 2007, Pearl et al., 1995). Zudem kann durch die variable Lage der Appendix im Abdomen das Punktum Maximum des Schmerzes in seiner Lage deutlich variieren, was die Diagnose zusätzlich erschwert und gegebenenfalls andere Differentialdiagnosen wahrscheinlich erscheinen lässt. Die Wahrscheinlichkeit einer initialen Fehldiagnose einer AA beträgt bei Kindern > 2 Jahren bis zu 57% (Singh et al., 2014). Zudem liegt das Risiko einer Perforation im Kindesalter mit bis zu 75%, abhängig von der Studiengruppe, deutlich höher als bei Erwachsenen, was eine solche Verzögerung der Diagnose umso gefährlicher macht (Bekele and Mekasha, 2006, Cappendijk and Hazebroek, 2000, Singh et al., 2014).

1.1.3.2 Labordiagnostik

Der diagnostische Wert von Laboruntersuchungen bei Verdacht auf AA ist umstritten. Es existieren keine spezifischen Marker und die Aussagekraft von Entzündungsmarkern wie dem C-reaktiven Peptids (CRP) oder einer Linksverschiebung der weißen Blutkörperchen wird kontrovers diskutiert. Bisher konnte für keinen einzelnen Marker und keine Kombination von labortechnischen Untersuchungen eine annehmbare Sensibilität oder Spezifität nachgewiesen werden, welche die nötige diagnostische Sicherheit für das Vorliegen einer AA erbringen könnten (Beltran et al., 2007, Bundy et al., 2007). Trotzdem können eine Leukozytose, Linksverschiebung oder positive CRP-Werte hilfreich sein, um eine klinische Verdachtsdiagnose einer AA zu unterstützen (Andersson, 2004, Bates et al., 2014). Im Allgemeinen dient die Erhebung dieser Parameter vor allem dem Ausschluss von Differentialdiagnosen oder der Einschätzung des Schweregrades der Entzündung (Zielke, 2002). Dennoch gehen beispielsweise normale Leukozytenwerte mit einer hohen Rate an Negativ-Appendektomien einher (Gronroos and Gronroos, 1999). Die höchste diagnostische Sensitivität hat laut Andersson eine Kombination von Leukozyten und CRP (Andersson, 2004).

1.1.3.3 Bildgebung

Der Einsatz von bildgebenden Verfahren kann die diagnostische Sicherheit signifikant erhöhen. Insbesondere die Ultraschalluntersuchung rückt immer weiter in den Vordergrund. Die einfache und kostengünstige Durchführung, schnelle Verfügbarkeit und

Nebenwirkungsfreiheit tragen dazu bei, dass es sich zum Hauptverfahren in der Darstellung der Appendix entwickelt hat (Rentea et al., 2017). Die Appendix kann häufig über den Iliakalgefäßen liegend dargestellt werden, sowohl eine subzökale als auch retrozökale Lage kann wiedergegeben werden (Lee et al., 2005). Eine normale Appendix erscheint in der Sonografie als komprimierbare, blind-endende Struktur mit einer Wandstruktur ähnlich des Darmes und einem Durchmesser <6mm (Gongidi and Bellah, 2017). Der Wandaufbau besteht aus fünf klar begrenzten Schichten: die äußerste echogene Serosa, die hypoechogene Lamina muscularis propria, die hyperechogene Submucosa, die echoarme Lamina muscularis mucosae und die innerste hyperechogene Mucosa. Überdies spielt die Abdomensonografie auch für die Differentialdiagnostik von Schmerzen im rechten Unterbauch bei Kindern und Jugendlichen eine große Rolle (Gongidi and Bellah, 2017). Entitäten wie mesenteriale Lymphadenitis, Inflammationen des Darmes, Meckel-Divertikel, Invaginationen, Urolithiasis und Pyelonephritis, sowie geschlechtsspezifische Erkrankungen (Ovarialzysten, Ovarialtorsion etc.) können dargestellt werden (Gongidi and Bellah, 2017, Peletti and Baldisserotto, 2006, Sung et al., 2006).

Allerdings ist die Ultraschalluntersuchung stark vom Untersucher abhängig und die Ergebnisse sehr variabel (Zielke et al., 2001). Die Darstellung der Appendix erfordert zudem ein hohes Maß an Erfahrung und anatomische Gegebenheiten wie Übergewicht oder Gasüberlagerung erschweren die Untersuchung zusätzlich (Galindo Gallego et al., 1998).

Besondere Bedeutung kommt der Ultraschalluntersuchung zu, wenn bereits Komplikationen wie ein perityphilitischer Abszess oder eine freie Perforation mit Flüssigkeit im Abdomen vorliegen. Die perforierende Appendizitis wurde bereits in mehreren Studien als Tücke der Ultraschalldiagnostik beschrieben (Tulin-Silver et al., 2015). Die perforierte Appendix verliert ihre Beschaffenheit und kann dekomprimieren, sodass sie strukturell nicht mehr dargestellt werden kann (Tulin-Silver et al., 2015).

Im Vergleich zur Sonografie kann die Computertomografie eine Sensibilität und Spezifität von nahezu 100% aufweisen (Birnbbaum and Wilson, 2000). Zudem sind die Ergebnisse deutlich weniger abhängig vom Untersucher und Perforationen können sicher identifiziert werden (Gongidi and Bellah, 2017). Doch die hohen Kosten und eingeschränkte Verfügbarkeit limitieren den Einsatz. Zudem gehen CT-Untersuchungen mit einer hohen Strahlenbelastung einher, die besonders, wenn im Kindesalter appliziert, zu einer deutlich

erhöhten Rate an Neoplasien führt (Kim et al., 2014, Rosenbaum et al., 2017, Rentea et al., 2017). Außerdem wird vor allem bei der Untersuchung von kleinen Kindern bei altersentsprechend fehlender Compliance eine Sedierung notwendig. Insgesamt kommt die CT-Untersuchung im deutschsprachigen Raum in der Routinediagnostik der AA nur im Einzelfall zum Einsatz.

1.1.4 Therapie

1.1.4.1 Operative Therapie

Die operative Entfernung der Appendix stellt nach wie vor das Standardverfahren zur Therapie der AA dar. Obwohl die Appendektomie eine häufige und bewährte Operation ist, besteht wenig Einigkeit über die Methode. In der Kinderchirurgie reicht die Bandbreite der Verfahren von offen über laparoskopisch bis hin zur single-incision laparoscopic surgery (SILS) (Bergholz et al., 2015, Tiboni et al., 2014). Metaanalysen und systematische Reviews konnten zeigen, dass laparoskopische Appendektomien (LA) mit signifikant niedrigeren Komplikationsraten, weniger postoperativen Schmerzen, schnellerer Rekonvaleszenz und kürzerer Krankenhausverweildauer einhergehen (Cheong and Emil, 2014, Li et al., 2010). Im deutschsprachigen Raum hat sich die LA daher weitestgehend durchgesetzt, jedoch steigt die Anzahl der offenen Appendektomien je jünger die betroffenen Kinder sind. Vor allem das Timing der chirurgischen Intervention wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert.

1.1.4.2 Konservative Therapie

Trotz der Fortschritte in der operativen Technik der chirurgischen Entfernung der Appendix geht mit der Appendektomie im Kindesalter eine signifikante Morbidität und Mortalität einher. Man geht davon aus, dass es sich bei Kindern und geriatrischen Patienten in bis zu 50% um sogenannte Negativ-Appendektomien ohne histopathologischen Nachweis einer Entzündung handelt, sinngemäß übersetzt also um unnötige Appendektomien (Sack et al., 2006). Eine finnische Studie postulierte zudem, dass 75-85% aller unkomplizierten Appendizitiden konservativ mit einer antibiotischen Therapie behandelt werden können (Paajanen et al., 2013). In der Summe ergibt sich daraus pro Jahr gerechnet ein enormes Patientenkollektiv, dem ein invasiver Eingriff

erspart werden könnte. Hinzu kommen die Kostenersparnisse durch teure Operationen und die längere stationäre Verweildauer (Paajanen et al., 2013).

Eine schwedische Pilotstudie konnte bereits die Effektivität und Sicherheit einer konservativen Therapie mit Antibiotika bei Kindern zeigen (Svensson et al., 2015). Aktuell erfolgt die prospektive multizentrische, randomisierte Studie zur konservativen Therapie bei Verdacht auf akute unkomplizierte Appendizitis, das Studienprotokoll wurde bereits veröffentlicht (Hall et al., 2017). Der Vorteil einer konservativen Therapie bei akuter Appendizitis im Kindesalter ist nicht nur die Vermeidung des immer mit einer Operation einhergehenden Gewebe-Traumas, sondern auch die Umgehung einer Allgemeinanästhesie und möglicher Konsequenzen und Risiken, sowie der soziale Aspekt einer Operation und Hospitalisierung. Die Inzidenz von relevanten Anästhesiebezogenen Komplikationen in pädiatrischen Kohorten ist mit 3,4% erheblich und vergleichbar mit erwachsenen Kohorten (de Graaff et al., 2015). In unseren Studien mit einer Population von insgesamt mehr als 1400 Appendektomien traten keinerlei anästhesiologische Komplikationen auf. Entscheidend ist jedoch, dass in unserer Klinik alle Narkosen an Kindern von speziell geschulten Kinderanästhesisten durchgeführt werden, während in Deutschland mehr als 2/3 aller Narkosen im Rahmen von Appendektomien im Kindesalter von pädiatrisch nicht-geschulten Anästhesisten in allgemeinchirurgischen Abteilungen vollzogen werden (Gosemann et al., 2016). Die Komplikationsraten könnten daher in diesem Setting deutlich höher liegen.

Die bisherigen Daten zur konservativen Therapie beziehen sich ausschließlich auf erwachsene Populationen und alle konservativen Therapieansätze beschränken sich ausschließlich auf Patienten mit vermuteter unkomplizierter Appendizitis, obwohl bisher kein valides Verfahren zur Unterscheidung der Entitäten etabliert wurde (Hansson et al., 2009, Salminen et al., 2015, Styrud et al., 2006, Vons et al., 2011, Wilms et al., 2011).

1.2 Fragestellung

Die Zielstellung der hier gesammelten Studien war die Etablierung eines Modells zur präoperativen Entscheidungsfindung bei klinisch vermuteter akuter Appendizitis im Kindesalter. Aufgrund der Unzuverlässigkeit der klinischen Präsentation insbesondere bei sehr jungen Kindern lag der Fokus auf Untersucher-unabhängigen Parametern wie der routinemäßig abgenommenen Labordiagnostik und regelmäßig durchgeführten

Ultraschalldiagnostik. Zusammenfassend wurden in den vorliegenden Arbeiten zwei Fragestellungen bearbeitet:

- 1.) Welche Parameter im Rahmen der Labor- und sonografischen Routinediagnostik können für die Unterscheidung von unkomplizierter und komplizierter Appendizitis genutzt werden?
- 2.) Lassen sich KI-Methoden auf Basis objektiver Parameter zur Diagnostik bei der Appendizitis im Kindesalter und insbesondere zur Differenzierung von unkomplizierter und komplizierter Appendizitis nutzen?

2 Material und Methoden

Alle Patienten der hier genannten Studien wurden in der Kinderchirurgie des Otto-Heubner-Centrum, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, behandelt. Bei den hier vorliegenden Arbeiten handelt es sich um retrospektive Datenanalysen.

2.1 Patientendaten

Für die Erhebung des Patientenkollektivs wurde eine computergestützte Datensuche mittels „OpDIS Support System“ der Charité durchgeführt, um alle Patienten unter 18 Jahren, die im Zeitraum Januar 2008 bis Juni 2016 gemäß ICD-10 (International Classification of Diseases) unter der Verdachtsdiagnose einer akuten Appendizitis in der Kinderchirurgie der Charité behandelt wurden, zu identifizieren. Hierfür wurden alle K35-Diagnosen geltend gemacht. Aus der mit diesem System erstellten Kohorte wurden lediglich appendektomierte Patienten in die Datensammlung eingeschlossen.

Die Patientendaten wurden aus den Patientenakten sowie den vorliegenden Operationsberichten und Anästhesie-Protokollen extrahiert und im Softwareprogramm Excel 2011 (Microsoft Office für Mac, Microsoft Corporation 2010, Redmond, USA) erfasst. Patienten, die aufgrund der codierten Diagnosen mehrfach aufgeführt wurden, zum Beispiel aufgrund von Wiederaufnahme bei postoperativen Komplikationen, Rezidiven oder Intervall-Appendektomien, wurden lediglich unter der mit einer Appendektomie als chirurgische Intervention verbundenen Fallnummer gelistet.

Für alle Studien wurden nur Patienten eingeschlossen, die auf Basis der Krankenakte vollständige Datensätze für alle zu untersuchenden Parameter aufwiesen. Unvollständige Datensätze führten demnach zum sofortigen Ausschluss.

2.2 Methoden

Die eingeschlossenen Patienten wurden in allen drei Studien anhand ihres histopathologischen Ergebnisses entsprechend der Definition vorangegangener Studien in folgende Gruppen eingeteilt (Fallon et al., 2013a, Fallon et al., 2013b, Fallon et al., 2015, St Peter et al., 2008):

Phlegmonöse Appendizitis :

Die Appendix ist entzündlich aufgetrieben und hyperämisch; alle Wandschichten zeigen ein ausgeprägtes granulozytäres Infiltrat und die Serosa weist ein fibrinösen Belag auf.

Gangränöse Appendizitis:

Es finden sich ischämische Areale, Myonekrosen und gegebenenfalls Abszesse in allen Wandschichten.

Perforierende Appendizitis:

Es zeigt sich ein vollständiger transmuraler Defekt. Häufig findet sich zudem eine Periappendizitis, bei der ist zudem das Mesenteriolum mitbetroffen.

Negativ-Appendizitis:

Es liegt kein Kriterium für die Einordnung in eine der anderen Gruppen oder eine unabhängige andere pathologische Veränderung der Appendix vor.

Bei Abweichung des OP-Berichtes bzw. des verschriftlichten Eindrucks des operierenden Chirurgen vom histopathologischen Befund erfolgte die Gruppeneinteilung immer auf Basis der Histologie.

2.2.1 Studie I

Die Daten aller Patienten zwischen 7 und 14 Jahren, die im Zeitraum von Januar 2008 und Juni 2016 in der Kinderchirurgie der Charité appendektomiert wurden, wurden retrospektiv ausgewertet. Die präoperative Diagnostik für eine vermutete Appendizitis umfasst in der Kinderchirurgie der Charité neben einem CRP-Wert stets ein Differentialblutbild (inklusive Leukozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten und Lymphozyten). Zusätzlich zum Differentialblutbild wurde die Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio für jeden Patienten errechnet, indem die totale Anzahl der neutrophilen Leukozyten durch die Anzahl der Lymphozyten geteilt wurde. Für die Analyse der Laborwerte wurden jeweils die bei stationärer Aufnahme erhobenen Werte berücksichtigt.

Um eine Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten, wurden außerdem Alter, Geschlechterverteilung und folgende Zeitintervalle verglichen: der zeitliche Verlauf der

Symptomatik und die zeitliche Verzögerung bis zur Operation. Beginn der Symptomatik wurde definiert als der Zeitpunkt, seit dem der Schmerz bis zur Vorstellung in der Rettungsstelle persistierte. Zusätzlich wurde vergleichend die zeitliche Entwicklung von innerhalb definierter Zeitintervalle nach Auftreten der Symptome betrachtet: 0-12h, >12-24h, >24-36h, >36-48h, >2-3d, >3-4d. Bei vagen Zeitangaben, wie beispielsweise „morgens“, „mittags“, „abends“ oder „nachts“ wurde der Zeitpunkt des Symptombeginns jeweils 6, 12, 18 oder 24 Uhr zugeordnet. Uhrzeitliche Angaben der Patienten oder deren Eltern wurden \pm 30 Minuten auf-/abgerundet. Symptomdauern von mehr als 48 Stunden wurden auf ganze Tage auf-/abgerundet und sind demnach \pm 12 Stunden angegeben. Die Symptomdauer ist in Tagen angegeben und in Dezimalform dargestellt. Die Zeitspanne zwischen Aufnahme und Operation wurde anhand der im SAP-System hinterlegten Zeit des ersten Arztkontaktes und den im Operationsbericht hinterlegten OP-Beginn berechnet und auf volle Stunden aufgerundet. CRP und Leukozyten-Werte wurden zusätzlich innerhalb dieser Zeitintervalle betrachtet und verglichen. Mittelwerte der Zeitintervalle gelten als aussagekräftig, wenn wenigstens 10 Patienten pro Zeiteinheit eingeschlossen werden konnten.

Ausschlusskriterien beinhalteten Vorerkrankungen, elektive Appendektomie, präoperative Einnahme von Antibiotika, fehlendes Einverständnis der Patienten/Eltern und unvollständige Daten.

Gemäß ihrer Histopathologie wurde die Kohorte anhand der oben genannten Kriterien in drei Gruppen klassifiziert: phlegmonös (ph), gangränös (Akdis et al., 2011) und perforierend (Pecaric-Petkovic et al., 2009).

2.2.2 Studie II

Alle appendektomierten Patienten unter 18 Jahren, die im Zeitraum von Januar 2008 bis Juni 2016 appendektomiert wurden, wurden verglichen. Neben Stammdaten und Laborergebnissen wie in Studie I wurden nochmals die klinischen Verläufe der Patienten evaluiert. Zeitverläufe wurden wiederum in Intervalle von jeweils 12 Stunden nach dem Auftreten erster Symptome unterteilt: 0-12h, 12-24h, 24-36h, 36-48h, 48-72h, >72h. Patienten mit einer Symptomdauer mit einer längeren Symptomdauer wurden in der Kategorie >72h zusammengefasst. Laborwerte wurden gegen die zeitliche Spanne der Symptomdauer, Latenz zwischen stationärer Aufnahme oder der totalen Zeitspanne aufgetragen.

Die Ausschlusskriterien entsprechen denen aus Studie I. Zusätzlich wurden alle Patienten, die unabhängige histopathologische Auffälligkeiten wie beispielsweise Karzinoide oder Oxyuriasis zeigten ausgeschlossen.

Gemäß ihrer Histopathologie wurde die Kohorte anhand der oben genannten Kriterien in 4 Gruppen klassifiziert: phlegmonös (*unkompliziert*, uc), gangränös (Akdis et al.) und perforierend (Pecaric-Petkovic et al.) (gg+pf, zusammengefasst als *kompliziert*, co) und Negativ (Kontrollgruppe, neg) (Carr, 2000, Fallon et al., 2015).

2.2.3 Studie III

Es wurden alle Patienten im Alter von 0 bis 17 Jahren retrospektiv untersucht, die zwischen Dezember 2006 und September 2016 eine präoperative Ultraschalldiagnostik unter der Verdachtsdiagnose einer akuten Appendizitis erhielten. Patientenakten wurden hinsichtlich der Stammdaten (s.o.), sowie Zeitpunkt der stationären Aufnahme und Operation, Histopathologie und Ultraschallbefund untersucht. Die Ausschlusskriterien entsprachen denen in Studie II.

Alle Sonografien wurden von erfahrenen Fachärzten der Abteilung für Kinderradiologie durchgeführt oder supervidiert. Abhängig von der Konstitution des Patienten wurde ein Konvex- oder Linear-Schallkopf durchgeführt (1 MHz vs. 12 MHz). Die Befunde der Sonografien wurden hinsichtlich routinemäßig beschriebener Befunde analysiert, welche auch in vorangegangenen Studien untersucht wurden (Blumfield et al., 2013, Carpenter et al., 2017, Tulin-Silver et al., 2015):

- *Durchmesser der Appendix*: Gemessen jeweils von äußerster Schicht zu äußerster Schicht
- *Wandödem*: Auslöschung der einzelnen Wandschichten
- *Entzündung von periappendizitischem Fettgewebe*: erhöhte Echogenität des periappendizitischen Gewebes
- *freie intraabdominelle Flüssigkeit*: einfache und formierte Flüssigkeitsansammlungen ohne Berücksichtigung der Lokalisation
- *Abszessformation*: Berandeter periappendizitischer Flüssigkeitsverhalt
- *Konglomerate*: Appendix ununterscheidbar mit intestinalen Strukturen verbacken
- *Appendikolith*: Intraluminaler hyperechogener Focus mit akustischem Schatten
- *Lymphadenitis mesenterialis*: Sonografisch detektierbare mesenteriale Lymphknoten

In einigen Fällen wurde vom Radiologen eine Perforation vermutet aufgrund der gesehenen pathologischen Strukturen.

Vage Ultraschallbefunde wurden während des Analyse-Prozesses mit den dienstältesten Kinderradiologen diskutiert und entsprechend der definierten Kategorien eingeordnet.

Das Patientenkollektiv wurde anhand die histopathologischen Befunde in drei Gruppen entsprechend den oben genannten Kriterien (s. 2.2) eingeteilt: phlegmonöse Appendizitis (AUA), gangränöse Appendizitis und Perforierende Appendizitis (zusammengefasst als ACA).

2.2.4 Studie IV

In Kooperation mit der OakLabs GmbH in Henningsdorf wurden einige der erhobenen Parameter aus Studie I, II und III (Differentialblutbild, CRP, Appendix-Durchmesser) einem Algorithmus für maschinelles Lernen unterzogen, um eine Vorhersage der histopathologischen Entität zu generieren.

Parameter von insgesamt 937 Patienten im Alter von 0-17 Jahren, sowie von 240 Patienten mit histopathologisch negativem Befund wurden retrospektiv mit Algorithmen aus dem maschinellen Lernen (ML) und der künstlichen Intelligenz (KI) analysiert. Als Parameter wurden verwendet: Differentialblutbilder, C-reaktives Protein (CRP) und sonographisch gemessener Appendixdurchmesser. Ein Algorithmus für maschinelles Lernen wurde verwendet, um ein Prädiktionsmodell für die Diagnostik einer akuten Appendizitis zu kreieren, basierend auf relevanten Biomarkern. Der Prozess war unterteilt in Erkenntnis- und Validierungsphase:

- 1) Die Modelkonstruktion und Auswahl der Biomarker aus den erhobenen Parametern erfolgte an einem Anteil der Daten, genannt „discovery set“
- 2) Die Leistungsfähigkeit des endgültigen Modells wurde am zweiten Abschnitt der Daten, genannte „validation set“ getestet.

Die Eingabedaten setzten sich aus n Proben zusammen, wovon jede einzelne durch p Variablen bestehend aus den bekannten Biomarkern charakterisiert wurde. Dementsprechend ergab sich eine Datenmatrix X mit n Zeilen und p Spalten.

Während der Erkenntnis-Phase wurde zunächst eine Sequenz der bestimmten Parameter erstellt ($bm_1, \dots, bm_j, \dots, bm_m$) und anschließend eine binäre Klassifikation eingesetzt wie in einem linearen Model mit den Spalten p_{bmj} entsprechend denen der

Biomarker-Reihen. Die Parameter des linearen Modells wurden mittels Limited-memory BFGS (LBFGS) Algorithmus optimiert. Aufgrund der unterschiedlichen Stichprobengröße in den beiden Gruppen ('complicated' + 'uncomplicated'/'negative') wurden die Lernfehler verhältnismäßig zu der Gruppe mit der größeren Stichprobengröße mit einer Gewichtskoeffizienten während des Optimierungsprozesses bewertet. Auf diese Art und Weise wurde die Qualität einer jeden Biomarker-Reihe mit derselben Genauigkeit wie die Kreuzvalidierung gemessen.

Es wurde zudem versucht, selektiv den Einfluss der sonografischen Parameter innerhalb der Biomarker-Reihe zu untersuchen. Zur Befundung einer Appendizitis wurden 390 Patienten verwendet zur Validierung der Biomarker-Reihe, welche ausschließlich aus Labor-Parametern bestand. Weitere 350 Patienten wurden zur Validierung von Biomarker-Reihe, welche sonographische Parameter einschlossen. Zur Differenzierung von komplizierter und unkomplizierter Appendizitis wurden nochmals 395 Patienten mit reinen Labor-Biomarker-Reihen validiert, während 337 Patienten mit zusätzlichen Sonographie-Parametern in den Biomarker-Reihen validiert wurden.

2.3 Statistik

Zur statistischen Analyse wurden GraphPad Prism Software (Version 6.0f, La Jolla, CA) und SPSS (IBM, Version 25) genutzt.

Da es sich bei allen Studien um retrospektive Datenanalyse handelt, wurden keine Stichprobengrößen (Leistungsanalyse) berechnet. Dennoch haben alle hier aufgeführten Studien eine suffiziente Teststärke, um auch kleine Effektgrößen zu zeigen.

Deskriptive Verfahren wie die Errechnung des Mittelwerts, der Standardabweichung und Standardfehler wurden zur Erfassung von Häufigkeiten verwendet. Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung und Standardfehler angegeben. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0.01$.

2.3.1 Studie I und II

Mittels Youden's Index (= Sensitivität + Spezifität – 1) wurden anhand von ROC-Kurven (Receiver-Operating-Characteristic-Kurve) Signifikanzen evaluiert. Parameter, deren errechnete Fläche unter der Kurve größer als 0,5 war, wurden als relevanter Parameter zur Unterscheidung zwischen komplizierter und phlegmonöser Appendizitis erachtet.

Trotz der dabei etablierten Grenzwerte zielte diese Berechnung nicht auf die Etablierung klinisch relevanter Werte zur Unterscheidung der Entitäten ab. Vielmehr war das Ziel die Stützung unserer Hypothese von unterschiedlichen Entitäten der Entzündung. Nach Ausschluss der Normalverteilung durch Box-Plot-Analyse, führten wir einen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durch zur Überprüfung der Signifikanz der unverbundenen Stichproben, sowie eine Chi-Quadrat-Berechnung für die kategorialen Variablen.

2.3.2 Studie III

Kategoriale Variablen wurden als Häufigkeiten und Prozente angegeben, kontinuierliche Variablen als Mittelwert \pm Standardabweichung. Für jeden sonografischen Parameter wurden hinsichtlich der histopathologischen Diagnose einer komplizierten Appendizitis univariate Regressionsanalysen durchgeführt. Um ein adäquates Model für die Regressionsanalyse aufzustellen, wurde zunächst eine Rückwärtselimination basierend auf der Likelihood-Funktion durchgeführt, sodass Variablen mit $p \geq 0.1$ ausgeklammert wurden. Daher wurden lediglich die folgenden Parameter in der Regressionsanalyse berücksichtigt: Appendixdurchmesser, Entzündung des periappendizitischen Fettgewebes, Bildung von Konglomeraten, Anwesenheit eines Appendikolith oder vom Radiologen vermuteter Perforation.

Ergebnisse wurde als Chancenverhältnis (Odds Ratio, OR) mit einem Konfidenzintervall (KI) von 95% dargestellt. Für jeden berücksichtigten sonografischen Parameter wurde Sensitivität, Spezifität und der positive und negative Vorhersagewert berechnet.

2.3.3 Studie IV

Das beste Model mit den passenden Koeffizienten wurde verwendet, um die Diagnose eines Patienten mit Klassenwahrscheinlichkeit vorherzusagen. Die resultierenden Klassenwahrscheinlichkeiten können als Grenzwerte zwischen den Klassenprognosen interpretiert werden. Jeder Grenzwert stellt einen Zielkonflikt des Models dar, die Anzahl der echten/falschen Positiven und echten/falschen Negativen vorherzusagen.

Die diagnostischen Fähigkeiten des Models (Sensibilität und Spezifität) wurden anhand eines Validierungssets geprüft, bei welchem die prognostizierten echten/falschen Positiven zu verschiedenen Grenzwerten gezählt wurden. Die Ergebnisse wurden mittels ROC-Graphen dargestellt.

Die Fehlerquotienten für Interessenspunkte in den ROC Graphen wurden mit Hilfe von Bootstrap-Stichprobenwiederholung ermittelt. Während der ROC-Analyse wurden die Ergebnisse der Biomarker-Signaturen mit folgenden Laborparametern verglichen: CRP, Leukozyten und Neutrophile Granulozyten. Ausgewählte Punkte der ROC-Kurve, die mit Youden's Index errechnet wurden, wiesen eine hohe Sensibilität mit höchst möglicher Spezifität auf. Ziel dieser Auswahl war es so viele Patienten wie möglich zu diagnostizieren und nicht-erkrankte Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können.

2.4 Wissenschaftliche Praxis

Patientendaten wurden jeweils von zwei verschiedenen Personen unabhängig gesichtet und ausgewertet. Im Falle widersprüchlicher Daten wurden die Ergebnisse diskutiert und gegebenenfalls korrigiert. Ein erfahrener Wissenschaftler kontrollierte alle Daten und Ergebnisse. Aus Datenschutzgründen wurden alle Patienten durch eine Fallzahl verschlüsselt, sodass nur Personal mit Zugang zum internen Charité-SAP-System die Daten rückverfolgen können.

2.5 Ethik

Für die retrospektive Analyse aller hier aufgeführten Daten wurde ein Ethikvotum unter der Antragsnummer EA2/169/18 eingeholt.

Ein generelles Einverständnis für pseudonymisierte, retrospektive Datenanalysen wurde routinemäßig von allen Patienten bzw. deren gesetzlichen Vertretern im Rahmen der stationären Aufnahme eingeholt.

3 Ergebnisse

3.1 Studie I

931 Appendektomien wurden im Zeitraum von Januar 2008 bis Juni 2016 an Kindern im Alter von 7-14 Jahren durchgeführt. Insgesamt wurden 284 Patienten aufgrund der festgelegten Kriterien ausgeschlossen. Folglich wurde eine Studienpopulation von 647 Patienten in die Studie eingeschlossen. Davon zeigten 395 Patienten (61.1%) eine phlegmonöse (unkomplizierte) Appendizitis, 252 Patienten (38.9%) eine komplizierte Appendizitis (Gangränöse Appendizitis $n=73$, 11.3%, Perforierende Appendizitis $n=179$, 27.7%). 390 Kinder (60.3%) waren männlichen Geschlechts ohne signifikante Unterschiede bezüglich der Geschlechterverteilung zwischen den Gruppen. Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in der Altersverteilung [11.7 ± 4.1 (ph) vs. 10.6 ± 2.1 (co)].

Die durchschnittliche Zeitspanne zwischen Beginn der Symptome und Operation war bei gangränöser und phlegmonöser Entzündung vergleichbar [1.9 ± 1.1 Tage (ph) vs. 1.8 ± 1.2 Tage ; $P > 0.01$]. Beide Gruppen lagen jedoch weit unter den Werten der Gruppe mit perforierenden Appendizitiden (2.5 ± 2.0 Tage; $P < 0.0001$ und $P < 0.001$, respektive). Hinsichtlich der Latenz zwischen stationärer Aufnahme und Operation gab es keine signifikanten Unterschiede: Komplizierte Appendizitis 9.2 ± 10.2 h, phlegmonöse Appendizitis 9.8 ± 8.6 h ($P > 0.01$).

Die Entzündungsverläufe der Patienten mit komplizierter Appendizitis war gekennzeichnet durch einen konstanten Anstieg der CRP-Wert von durchschnittlich 27.5 mg/L innerhalb der ersten 12 Stunden nach Symptombeginn auf durchschnittlich 107.98 mg/L am vierten Tag nach Symptombeginn. Patienten mit phlegmonöser Appendizitis zeigten einen ähnlichen Verlauf, jedoch auf einem signifikant geringeren Niveau mit 6.65 mg/L innerhalb der ersten 12 Stunden bis zu einem Maximum von 24.57 mg/L nach >24h. Nach 36 Stunden beschrieben die CRP-Werte in der phlegmonösen Gruppe jedoch einen Abfall bis auf 19.75 mg/L (> 3–4 Tage). Im Verlauf zeigten die durchschnittlichen Leukozyten-Werte einen geringen Rückgang bei Patienten mit ACA (Maximum $16.97 \times 10^9/L$ 0–12 h, Minimum $14.1 \times 10^9/L$ > 3–4 Tage), lagen dabei aber konstant über denen der Patienten mit phlegmonöser Appendizitis (Maximum $15.79 \times 10^9/L$ 0–12 h, Minimum $8.9 \times 10^9/L$ > 3–4 Tage).

Die Leukozytenzahlen waren insgesamt signifikant erhöht bei Patienten mit komplizierter Appendizitis gegenüber denen mit phlegmonöser Entzündung [$16.1 \pm 4.1 \times 10^9/L$ (co) vs. $14.1 \pm 4.8 \times 10^9/L$ (ph), $P < 0.0001$]. Bei Betrachtung der einzelnen Bestandteile des Differentialblutbildes zeigten Kinder mit komplizierter Appendizitis signifikant höhere Werte für neutrophile Granulozyten und Monozyten [neutrophile Granulozyten: $13.5 \pm 3.8 \times 10^9/L$ (co) vs. $11.6 \pm 4.5 \times 10^9/L$ (ph), $P < 0.0001$; Monozyten: $1.16 \pm 0.5 \times 10^9/L$ (co) vs. $0.93 \pm 0.33 \times 10^9/L$ (ph), $P < 0.0001$].

Im Gegensatz dazu konnte bei der phlegmonösen Appendizitis eine signifikante relative Eosinophilie und Basophilie gezeigt werden [eosinophile Granulozyten: $0.11 \pm 0.19 \times 10^9/L$ (ph) vs. $0.046 \pm 0.104 \times 10^9/L$ (co), $P < 0.0001$; basophile Granulozyten: $0.033 \pm 0.031 \times 10^9/L$ (ph) vs. $0.028 \pm 0.024 \times 10^9/L$ (co), $P < 0.001$]. Die Werte der Lymphozyten waren im Vergleich deutlich erniedrigt bei Patienten mit komplizierter Appendizitis [$1.31 \pm 0.59 \times 10^9/L$ (co) vs. $1.8 \pm 0.83 \times 10^9/L$ (ph), $P < 0.0001$]. Die Werte der zellulären Subkompartimente der Leukozyten waren, wie auch die Leukozyten als Ganzes betrachtet, über die Zeit stabil.

Alle untersuchten Subpopulationen zeigten in der ROC-Kurven-Analyse signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit komplizierter und phlegmonöser Appendizitis (AUC > 0.5): (Leukozyten: AUC 0.617, $P < 0.0001$, 95% CI 0.574–0.661; Neutrophile Granulozyten: AUC 0.648, $P < 0.01$, 95% CI 0.600–0.696; Monozyten: AUC 0.694, $P < 0.0001$, 95% CI 0.609–0.779; Eosinophile Granulozyten: AUC 0.709, $P < 0.0001$, 95% CI 0.661–0.757; Basophile Granulozyten: AUC 0.598, $P < 0.001$, 95% CI 0.546–0.651; Lymphozyten: 0.681, $P < 0.0001$, 95% CI 0.633–0.729). Es wurden aufgrund der differenzierenden Resultate Cut-Off-Werte, entsprechend den mittels Youden's Index errechneten prominentesten Punkten der ROC-Kurve, identifiziert zur Unterscheidung von komplizierten und phlegmonösen Entzündungen. Die errechneten Werte lagen dementsprechend bei > 13.58 für Leukozyten (Sensitivität 70.24, Spezifität 48.35), > 9.69 für Neutrophile Granulozyten (Sensitivität 77.08, Spezifität 45.48), > 1.235 für Monozyten (Sensitivität 42.11, Spezifität 83.49), < 0.0150 für Eosinophile Granulozyten (Sensitivität 60, Spezifität 72.56), < 0.0250 für Basophile Granulozyten (Sensitivität 57.95, Spezifität 57.05) und < 1.551 für Lymphozyten (Sensitivität 72.63, Spezifität 55.76).

3.2 Studie II

1448 Appendektomien wurden zwischen Januar 2008 und Juni 2016 an Kindern unter 18 Jahren durchgeführt. 407 Patienten wurden aufgrund der oben genannten Kriterien ausgeschlossen, sodass insgesamt 1041 Patienten eingeschlossen wurden.

Bei 489 Patienten (47%) lag eine unkomplizierte Appendizitis vor, bei 369 Patienten (35.4%) eine komplizierte Appendizitis, davon konnte bei 88 Patienten (8.5%) eine gangränöse Appendizitis gezeigt werden, in 281 Fällen eine perforierende Appendizitis (27%). Für die Kontrollgruppe wurden 183 Patienten identifiziert (17.6%)

Bei den epidemiologischen Daten zeigte sich, dass männliches Geschlecht häufiger vorlag ($n = 596$, 57.3%), Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung [10.6 ± 3.0 (Beltran et al.) vs. 9.6 ± 3.8 (co) vs. 11.7 ± 4.1 (neg)] zwischen den einzelnen Gruppen [unkompliziert (Beltran et al.), kompliziert (co) and Negativ (neg) Appendizitis].

Die durchschnittliche Zeitspanne zwischen Symptombeginn und Operation war in den Gruppen mit unkomplizierter und komplizierter Appendizitis jeweils vergleichbar (9.2 ± 8.7 vs. 7.8 ± 9.8 h; $p = n.s.$), allerdings zeigten beide Gruppen signifikant kürzere Zeitspannen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (16.4 ± 18.2 h; $p < 0.01$).

Für die Berechnung der zellulären Bestandteile des Differentialbluts und der CRP-Werte vor dem Hintergrund der Zeitverläufe konnte eine suffiziente Anzahl an Patienten nur für Zeitwerte bis maximal 3 Tage errechnet werden.

Der Verlauf der Entzündung bei Patienten mit komplizierter Appendizitis war gekennzeichnet von einem schnellen Anstieg der durchschnittlichen CRP-Werte, anfänglich bei 11.4 ± 3.2 mg/L innerhalb der ersten 12 Stunden nach Symptombeginn, erreichten Patienten nach >72 h Symptombdauer Werte von durchschnittlich 105.1 ± 83.8 mg/L. Patienten mit unkomplizierter Appendizitis zeigten einen anderen Verlauf: mit bereits initial signifikant niedrigeren CRP-Werten (3.4 ± 2.2 mg/L) erreichten diese das Maximum nach $>24-36$ h (25.6 ± 17.1 mg/L). Die Kontrollgruppe zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die unkomplizierten Appendizitiden hinsichtlich der CRP-Werte mit einem anfänglichen Minimum bei 1.5 ± 1.3 mg/L und einem Maximum von 13.6 ± 13.1 mg/L.

Unter Beachtung der Zeit waren die Leukozyten bei Patienten mit komplizierter Appendizitis stabil (0–12 h: $17.3 \pm 3.7 \times 10^9/L$, > 72 h: $16.1 \pm 3.1 \times 10^9/L$) und lagen

konstant über den Werten der Patienten mit unkomplizierter Appendizitis (0–12 h: $15.8 \pm 4.1 \times 10^9/L$, > 72 h: $13.4 \pm 5.8 \times 10^9/L$) sowie der Kontrollgruppe (0–12 h: $12.1 \pm 4.4 \times 10^9/L$, > 72 h: $9.5 \pm 5.0 \times 10^9/L$).

Unterteilt in die einzelnen Anteile des Differentialblutbildes zeigten Kinder mit komplizierter Appendizitis konstant erhöhte Werte hinsichtlich der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Vergleich mit Kindern mit unkomplizierter Appendizitis oder der Kontrollgruppe [Neutrophile Granulozyten: 0–12 h: $15.3 \pm 3.3 \times 10^9/L$, > 72 h: $12.6 \pm 4.9 \times 10^9/L$ (co) vs. 0–12 h: $12.7 \pm 3.8 \times 10^9/L$, > 72 h: $10.9 \pm 5.7 \times 10^9/L$ (Beltran et al.) vs. 0–12 h: $9.2 \pm 4.0 \times 10^9/L$, > 72 h: $6.7 \pm 3.8 \times 10^9/L$ (neg); Monozyten: 0–12 h: $1.2 \pm 0.6 \times 10^9/L$, > 72 h: $1.2 \pm 0.5 \times 10^9/L$ (co) vs. 0–12 h: $0.9 \pm 0.3 \times 10^9/L$, > 72 h: $0.9 \pm 0.4 \times 10^9/L$ (Beltran et al.) vs. 0–12 h: $0.8 \pm 0.4 \times 10^9/L$, > 72 h: $0.8 \pm 0.3 \times 10^9/L$ (neg)]. Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe der unkomplizierten Appendizitis über den gesamten Verlauf deutlich erhöhte Werte an eosinophilen Granulozyten im Vergleich mit der Gruppe der komplizierten Appendizitis [0–12 h: $0.003 \pm 0.005 \times 10^9/L$, > 72 h: $0.038 \pm 0.055 \times 10^9/L$ (co) vs. 0–12 h: $0.043 \pm 0.042 \times 10^9/L$, > 72 h: $0.039 \pm 0.047 \times 10^9/L$ (Beltran et al.)]. Der Verlauf der Entzündung hinsichtlich der Werte der basophilen Granulozyten zeigt eine relative Basophilie über die Zeit. Die Lymphozyten-Werte waren vergleichsweise erniedrigt bei Patienten mit komplizierter Appendizitis [0–12 h: $0.023 \pm 0.013 \times 10^9/L$, > 72 h: $0.029 \pm 0.015 \times 10^9/L$ (co) vs. 0–12 h: $1.646 \pm 0.758 \times 10^9/L$, > 72 h: $1.91 \pm 0.898 \times 10^9/L$ (Beltran et al.) vs. 0–12 h: $2.087 \pm 1.326 \times 10^9/L$, > 72 h: $2.096 \pm 0.885 \times 10^9/L$ (neg)].

Die Auswertung der ROC-Kurven zeigte suffiziente Werte >0.5 in Bezug auf CRP und alle untersuchten Bestandteile des Differentialblutbildes innerhalb beinahe aller definierten Zeitabschnitte.

3.3 Studie III

Insgesamt 1102 Patienten wurden im gegebenen Zeitraum per Ultraschall diagnostiziert und anschließend appendektomiert. Davon konnten 1017 in die Studie eingeschlossen werden. 56% der Patienten (n=566) waren männlich, 451 (44%) weiblich. Bei 794 Patienten (78%) konnte eine AA histopathologisch nachgewiesen werden, davon hatten 446 Patienten (56%) eine phlegmonöse Appendizitis (AUA) und 348 (44%) eine

komplizierte Appendizitis (ACA). Die Rate der Negativ-Appendektomien lag bei 22% (n=223).

Das durchschnittliche Alter betrug 10.7 Jahre. Patienten mit nachgewiesener AA (AUA und ACA) waren signifikant jünger als Patienten, bei denen sich die Diagnose nicht bestätigte (10.2 (0-17) vs. 12.3 (1-17), $P < .001$). Die Appendix konnte in 862 Fällen (85%) sonografisch dargestellt werden, bei den Patienten, die keine histopathologisch bewiesene Appendizitis hatten, gelang die Darstellung der Appendix nur in 24% (n = 54, 24% vs. n = 101, 13%; $P < 0.001$) der Fälle. Patienten mit AA (AUA und ACA) hatten einen signifikant größeren Appendix-Durchmesser als Patienten ohne AA (9.8 ± 2.5 mm vs. 7.2 ± 1.6 mm, $P < 0.001$). Die Befunde, in denen die Radiologen eine phlegmonöse Appendizitis vermuteten (n=180, 18%), stimmten in 48% mit der histologischen Untersuchung überein. In 145 Fällen (14%) vermuteten die Radiologen eine perforierende Appendizitis, dies bestätigte sich in 67% (n=97). In 692 radiologischen Befunden (68%) war keine Differenzierung zwischen AUA und ACA erkennbar.

In der Gruppe der Patienten mit ACA (n= 348) hatten 270 (78%) eine Perforation, 78 (22%) eine gangränöse Appendizitis. Das durchschnittliche Alter der Kinder mit ACA lag bei 9.4 Jahren (0-17) und war damit signifikant geringer als bei Kindern mit AUA (10.9 (1-17), $P < 0.001$). Der Appendix-Durchmesser war bei ACA signifikant größer als bei AUA (10.5 ± 2.6 mm vs. 9.3 ± 2.2 mm, $P < .001$).

In der univariaten Regressionsanalyse waren folgende sonografische Parameter signifikant mit einer ACA assoziiert: vergrößerter Appendix-Durchmesser (OR = 1.3, $P < 0.001$), (OR = 2.3, $P < 0.001$), freie Flüssigkeit intraabdominal (OR = 1.4, $P = 0.02$), Abszess (OR = 14.0, $P < 0.001$), Konglomerate (OR = 17.7, $P < 0.001$), Nachweis eines Appendikolithen (OR = 2.3, $P < 0.001$) und vom Radiologen vermutete Perforation (OR = 8.8, $P < 0.001$).

In der multivariaten Regressionsanalyse ergaben sich nur für Appendix-Durchmesser (OR = 1.3, $P < 0.001$), periappendizitische Fettinflammation (OR = 1.5, $P = 0.02$), Nachweis eines Appendikolithen (OR = 1.7, $P = 0.01$) und vom Radiologen vermutete Perforation (OR = 6.0, $P < 0.001$) signifikante Ergebnisse in der positiven Assoziation.

Ein Appendix-Durchmesser von mehr als 6mm hatte von allen statistisch signifikanten Parametern, die mit einer ACA assoziiert waren, die höchste Sensitivität mit 98%, allerdings war die Spezifität mit 11% sehr niedrig für diesen Parameter. Höhere

Spezifitäten konnte mit zunehmendem Appendix-Durchmesser (>6mm) beobachtet werden, in diesem Falle jedoch mit einer geringeren Sensitivität vergesellschaftet. Die höchste Spezifität wurde bei einer vom Radiologen vermutete Perforation erreicht (94%). Die Übereinstimmung der radiologisch vermuteten und histopathologisch bestätigten Perforationen lag bei 67% (n=97), allerdings zeigten die übrigen 33% folgende Pathologien: 20% (n=29) Phlegmonöse Appendizitis, 10% (n=14) gangränöse Appendizitis und 3% (n=5) eine negative Histopathologie.

3.4 Studie IV

Im Rahmen der Discovery ergab sich für die Diagnose einer akuten Appendizitis folgende Biomarker-Kombination: Basophile Granulozyten, Leukozyten, Monozyten, Neutrophilen Granulozyten, CRP und Appendixdurchmesser. Zur Unterscheidung von komplizierter und unkomplizierter Appendizitis ergab sich folgendes Muster: basophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten, CRP und Appendixdurchmesser. Anschließend wurden die erreichten Vorhersagewerte, mit denen der jeweils einzelnen Parameter verglichen. Die Accuracy der Biomarker-Signatur für die Diagnose einer Appendizitis betrug 90% (93% Sensitivität, 67% Spezifität), während die Accuracy für die korrekte Erkennung einer komplizierten Entzündung 70% betrug (76% Sensitivität, 67% Spezifität). Unsere Biomarker-Signaturen übertrafen in unserem Modell damit die Vorhersagewerte für die einzelnen Laborwerte wie CRP, Leukozyten- und Neutrophilenzahlen.

Die ROC-Kurven zur Diagnose einer akuten Appendizitis und der Differenzierung einer komplizierten Appendizitis zeigten erhöhte AUCs. Die Biomarker--Signatur wurden an ausgewählten Cut-off Punkten mit denen für CRP, Leukozyten und Neutrophilen verglichen. Bei beiden Anwendungen waren die jeweiligen Biomarker-Signaturen den konventionellen Laborwerten deutlich überlegen.

Während der Appendixdurchmesser fundamental für die diagnostische Funktion der analysierten Signatur ist (AUC 0.9 mit Appendixdurchmesser vs. 0.8 ohne Appendixdurchmesser), war dieser Parameter für die diagnostische Aussagekraft zur Differenzierung der komplizierten Appendizitis unerheblich (AUC 0.81 vs. 0.80).

4 Diskussion

Die AA stellt eines der häufigsten chirurgischen Krankheitsbilder im Kindesalter dar.

Die bis vor einigen Jahren – und auch heute noch omnipräsente – allgemein gültige Aussage, dass es sich bei der Appendizitis um ein obligat fortschreitenden Prozess von phlegmonöser Entzündung hin zur gangränösen Entzündung und schlussendlich in einer Perforation endend handelt, wurde bereits 1994 von der schwedischen Arbeitsgruppe um Andersson in Frage gestellt (Andersson et al., 1994). Seither gab es umfangreiche epidemiologische, histopathologische und klinische Studien, die den Fortschritt der Entzündung weitgehend widerlegten. Stattdessen wurden verschiedene Entitäten der Appendizitis postuliert, die sich im klinischen Verlauf unterscheiden. Das ultimative Ziel ist es, Kinder mit AA so akkurat wie möglich zu diagnostizieren und jedes Kind individuell und der Situation angepasst zu behandeln. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass der Trend in der Therapie der AA sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen immer zugunsten der konservativen Behandlungsmöglichkeiten geht (Mahida et al., 2016, Malik and Bari, 2009, Paajanen et al., 2013, Salminen et al., 2015, Styrud et al., 2006, Svensson et al., 2015, Vons et al., 2011, Wilms et al., 2011). Aktuelle Studien beschäftigen sich mittlerweile ausgehend von der Entitäten-Hypothese mit der Möglichkeit bestimmte Arten der Appendizitis konservativ zu therapieren und somit auf das Risiko einer Operation zu verzichten (Svensson, 2016, Svensson et al., 2012, Svensson et al., 2015). Dies stellt Kliniker vor die komplexe Aufgabe unkomplizierte und komplizierte Formen der Appendizitis voneinander zu unterscheiden. Derzeit basiert die Diagnostik der AA primär auf der klinischen Untersuchung, dem laborchemischen Nachweis einer systemischen Entzündung und der Bildgebung. Da hinsichtlich der klinischen Untersuchung weitgehend Einigkeit herrscht, beschäftigten wir uns in den vorgelegten Studien primär mit den letztgenannten Kriterien.

In **Studie I** und **II** konnten wir nicht nur zeigen, dass sich die Entitäten der AUA und ACA labordiagnostisch unterscheiden, sondern auch, dass diese Veränderungen über den Verlauf stabil blieben. Die bisherige Datenlage zur klinischen Bedeutung der Leukozyten in der Diagnostik der AA ist bestenfalls als ambivalent zu bezeichnen. Leukozyten und neutrophile Granulozyten wurden in der Vergangenheit als nützlich zur Einschätzung des Schweregrads der AA präsentiert (Sack et al., 2006). Die neutrophilen Granulozyten als zahlenmäßig stärkste Untergruppe machen häufig durch ihr relatives Gewicht den

Großteil der erhöhten Leukozytenwerte bei Patienten mit komplizierter Appendizitis aus. Interessanterweise wurde durch die Arbeitsgruppe um Marie Rubér bereits gezeigt, dass bei der komplizierten Appendizitis Th1- und Th17-Zytokin-Profile nachgewiesen werden können (Ruber et al., 2010, Ruber et al., 2006). Th1-abhängige Entzündungen sind wiederum vereinbar mit den erhöhten Monozyten bei Patienten mit ACA, die wir zeigen konnten. Basophile und eosinophile Granulozyten und Monozyten konnten in der bisherigen Forschung keinen Stellenwert in der Diagnostik der AA erreichen. In den vorgelegten Studien konnte jedoch ein zeitlich stabiler Unterschied in der zellulären Zusammensetzung der Leukozyten nachgewiesen werden. Dies bestätigt zum einen, dass es keinen fortschreitenden Prozess von phlegmonöser Entzündung hin zur gangränösen Entzündung gibt. Zum anderen unterstützt die Diskrepanz der Zell-Komposition der verschiedenen Gruppen die These, dass es sich um pathophysiologisch voneinander zu unterscheidenden Krankheitsbildern mit unterschiedlichem Verlauf handelt. In der vorgelegten Analyse der Zusammensetzung der weißen Blutkörperchen kam den Werten der eosinophilen Granulozyten bei den Patienten mit komplizierter Appendizitis eine besondere Bedeutung bei. Die eosinophilen Granulozyten waren bei Kindern mit phlegmonöser Entzündung deutlich erhöht. Auch wenn die erhöhten Werte für neutrophile Granulozyten, Monozyten und Leukozyten als Gesamtkompartiment betrachtet in der Gruppe der komplizierten Appendizitis als Ausdruck der insgesamt höheren Entzündungsaktivität des inflammatorischen Prozesses verstanden werden können, so erklärt dies nicht die Erhöhung der eosinophilen und basophilen Granulozyten im Rahmen der phlegmonösen Entzündung. Histopathologisch konnten in resezierten phlegmonös entzündeten Appendizes bereits in mehreren Studien eine Eosinophile Infiltration nachgewiesen werden (Aravindan et al., 2010).

Die Hochregulation der eosinophilen und basophilen Granulozyten wurde bereits als ein Th2-abhängiger Mechanismus einer Entzündungsreaktion bei phlegmonöser Appendizitis beschrieben (Ruber et al., 2006). Dieser Vorgang ist nur unzureichend durch andere Ursache zu erklären (Pecaric-Petkovic et al., 2009). Interessanterweise traten die signifikanten Unterschiede in der Mehrheit der Parameter zwischen den einzelnen Gruppen bereits innerhalb der ersten 12 Stunden nach Symptombeginn auf. Die Zeit zwischen stationärer Aufnahme und Operation war unabhängig von der histologischen Entität in den Gruppen (ACA und AUA) vergleichbar. Die ACA scheint sich jedoch primär

im prästationären Rahmen zu entwickeln. Dies ist konform mit der bisherigen Datenlage zum Verlauf der komplizierten Appendizitis (Almstrom et al., 2017).

In **Studie III** war das primäre Ziel sonografische Marker zu identifizieren, die retrospektiv am sensitivsten in der Diagnosestellung der AA und hilfreich in der Unterscheidung der Entitäten waren. Vor dem Hintergrund, dass die Differenzierung zwischen ACA und AUA therapeutische Konsequenzen hat (konservative Therapie vs. Operation abhängig von der Art der Entzündung), kommt der Bildgebung in der Diagnostik der AA entscheidende Bedeutung bei. Dabei ist vor allem in der Kinderchirurgie die Ultraschalldiagnostik als strahlungsfreie Bildgebung unabdingbar. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien mit geringerem Patientenaufkommen oder inhomogenem Kollektiv (beispielsweise durch Einschluss von sowohl Erwachsenen als auch Kindern, Vorerkrankungen etc.) konnten wir in der multivariaten Regressionsanalyse nicht nur den prädiktiven Stellenwert von verdicktem Durchmesser der Appendix oder dem Nachweis eines Appendikolithen für das Vorliegen einer komplizierten Appendizitis bestätigen (Blumfield et al., 2013, Carpenter et al., 2017), sondern auch eine signifikante Assoziation von komplizierter Appendizitis mit einer Entzündung des periappendizitischen Fettgewebes nachweisen. Dabei ist hier insbesondere der Einschluss von gangränösen Entzündungen ohne Perforation oder Abszessbildung in die Gruppe komplizierter Appendizitiden zu betonen.

Wir konnten bestätigen, dass eine >6mm im Durchmesser verdickte Appendix eine hohe Sensitivität für die Entdeckung einer AA hat. Allerdings war die Spezifität dieses Parameters unzureichend (11%). Bei einem Wertebereich von 2-13mm Durchmesser in der Kontrollgruppe liegt die Vermutung nahe, dass der Durchmesser allein zu einer erhöhten Rate an Negativ-Appendektomien führt. Bisher durchgeführte Studien konnten lediglich eine positive Assoziation von entzündetem periappendizitischen Fettgewebe mit dem Vorliegen einer komplizierten Appendizitis zeigen (Blumfield et al., 2013, Carpenter et al., 2017). Im Rahmen des großen Patientenkollektivs konnten wir hingegen eine starke Signifikanz nachweisen. Dies könnte auch auf den Einschluss von gangränösen Entzündungen in die Gruppe der komplizierten Appendizitis zurückzuführen sein. Diese Vermutung wäre konform mit den Ergebnissen von Xu et al., die einen Zusammenhang von entzündetem periappendizitischem Fettgewebe und Gangrän nahelegten (Xu et al., 2017).

Das Vorliegen eines Appendikolithen war ein hoch spezifischer Parameter für das Vorliegen einer komplizierten Appendizitis (90%) in der Analyse der sonografischen

Befunde. Allerdings war die Sensitivität für dieses Parameter gering, daher bietet er keine diagnostische Sicherheit. Andere Studien berichteten bereits über eine Rate von Therapieversagen von bis zu 60% in Fällen, bei denen ein Appendikolith nachgewiesen wurde (Mahida et al., 2016). Von besonderem Interesse scheint auch, dass Kinder mit Appendikolithen zum Zeitpunkt der Appendektomie signifikant jünger waren, als Kinder ohne Appendikolith. Diese Feststellung ist wiederum konform mit der Altersverteilung in den Gruppen der ACA und AUA.

Der Verlust der echogenen Submucosa war ein reproduzierbares sonografisches Zeichen, dass in vorangegangenen Studien mit einer Perforation vergesellschaftet war (Blumfield et al., 2013, Xu et al., 2017). In der vorliegenden Studie wurde dieser Parameter unter dem Begriff des „Wandödems“ untersucht. Eine signifikante Korrelation mit komplizierter Appendizitis konnten wir nicht bestätigen.

Zusätzlich untersuchten wir erstmals in dieser Art die Korrelation einer von den Kinderradiologen schriftlich vermuteten Perforation mit dem histopathologischen Diagnose, um fundiert einzuschätzen, wie reliabel die Beurteilung der Kinderradiologen bezüglich der tatsächlichen Diagnose ist. Es ergab sich eine Sensitivität von 32% und eine Spezifität von 94%, die tatsächliche Rate der Übereinstimmung lag bei 67%. Allerdings sollte bedacht werden, dass von den 48 unbestätigten Befunden in 29% eine gangränöse Entzündung vorlag (n=14), in 60% eine phlegmonöse Entzündung (n=29) und lediglich in 5 Fällen (10%) eine Negativ-Kontrolle. Da insgesamt jedoch nur in 32% aller Befunde überhaupt eine Einschätzung des Radiologen schriftlich festgehalten war, bleibt die tatsächliche Signifikanz dieses Parameters unklar und sollte in künftigen Studien weiter vertieft werden. Ein interessanter Aspekt war die Rate an Negativ-Appendektomien von fast 22%. Letztlich ist dies der Länge des untersuchten Zeitraums geschuldet. 2015 kam es zum Paradigmenwechsel in der Diagnostik, sodass ab diesem Zeitpunkt die OP-Indikation primär auf dem Ergebnis der Ultraschalldiagnostik basierte statt wie bis dato auf der klinischen Untersuchung. Dadurch konnte die Rate der Negativ-Appendektomien von einem Maximum von 28.5% im Jahr 2009 auf ca. 11% 2015 gesenkt werden. Dieses Ergebnis betont sicherlich essentiell die Bedeutsamkeit der Sonografie als bildgebendes Verfahren im Rahmend der Appendizitis-Diagnostik.

In **Studie IV** versuchten wir über die bereits erhobenen Ergebnisse der vorangegangenen Studien hinaus eine Biomarker-Signatur basierend aus untersucher-unabhängigen, routinemäßig erhobenen Parametern zu entwickeln. Es wurde weiterhin versucht die

Praktikabilität eines Mehr-Parameter-Modells zu testen. Durch den technischen Fortschritt ist die Verwendung von künstlicher Intelligenz in der Medizin aktuell von zunehmendem Interesse, insbesondere in Diagnostik und prädiktiver Analyse von Bildgebung und numerischen Werten. Die Verwendung von Instrumenten aus der KI in einem klinischen Setting erfordert kritisches Überdenken des klinischen Nutzens und gründliche Testung der Anwendbarkeit (Park and Han, 2018).

Zur Vermeidung methodischer Fehler wurden die Daten für Discovery und Validierung strikt voneinander getrennt, um einen klaren Aussagewert des Ergebnisses zu erhalten. Einige vorangegangene Studien, welche sich mit der Diagnostik der AA mittels Verwendung von KI beschäftigen, locken mit beeindruckenden Ergebnissen und hohen Spezifitäten und Sensitivitäten (Hsieh et al., 2011, Kessler et al., 2004). Allerdings fallen bei beiden Beispielen entscheidende methodische Schwächen auf: Neuronale Netze tendieren zum sogenannten „Overfitting“ der Daten (Park and Han, 2018). Bei den genannten Studien werden entweder die Größe der Trainings- und Validierungsgruppen nicht genannt oder die genannte Gruppengröße ist bei weitem zu klein für die Anzahl an Parametern des neuronalen Netzes.

Wir haben die Ergebnisse der Biomarker-Signaturen mit den allgemein verwendeten Entzündungsparametern innerhalb unseres Modells verglichen: Sensitivität, Spezifität, Fehlerfreiheit und AUC der traditionellen Werte wurden deutlich von denen der künstlichen neuronalen Netze (ANN) übertroffen. In der Validierungsphase konnte eine Treffsicherheit von 90%, eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 67% erreicht werden. Damit lässt sich sowohl die Wahrscheinlichkeit einer akuten Appendizitis unabhängig vom Untersucher einschätzen als auch auf Basis der ohnehin erhobenen Parameter eine Aussage über die Entität der Entzündung treffen. Die Überlegenheit dieses Ansatzes zur Diagnose von AA ergibt sich aus der Kombination einander ergänzender diagnostischer Verfahren: Laborwerte und sonografisch bestimmter Appendixdurchmesser. Dieses Ergebnis bedeutet einen entscheidenden Fortschritt in der Diagnostik der Appendizitis und der individuellen Therapie. Ein derartiges diagnostisches Werkzeug könnte auf Basis der hier vorgestellten Daten in unserem Modell jeden dritten Patienten ohne Appendizitis vor einer unnötigen Appendektomie bewahren.

4.1 Limitationen

4.1.1 Studie I und II

Eine Schwachstelle der hier aufgeführten Studien stellt ihr retrospektiver Charakter dar. Als ein Kritikpunkt mag aufgeführt werden, dass das Nachvollziehen des klinischen Verlaufes in der Retrospektive schwer einzuordnen und ungenau sei. Wir haben versucht dem entgegen zu wirken, indem wir 12-Stunden-Intervalle etablierten. Dieses Verfahren hat sich bereits in vorausgegangenen Studien bewährt. (Almstrom et al., 2017) Es wurden nur solche Patienten eingeschlossen, deren Krankenakte eine derartige zeitliche Zuordnung zuließ. Ziel dieser Studie (Studie II) war nicht die Festlegung spezifischer Werte für bestimmte Zeitpunkte im Krankheitsverlauf, sondern semiquantitative Aussagen über die relative Zusammensetzung der weißen Blutkörperchen bei unterschiedlichen Arten der Entzündung im Verlauf zu demonstrieren. Cutoff-Werte innerhalb der ROC-Kurven stellen notwendigerweise immer einen Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität dar und erlauben daher keine klinische Anwendung zur Unterscheidung von Patientengruppen. Allerdings dienten diese Studien zur Demonstration grundlegender Unterschiede innerhalb der zellulären Subkompartimente der Leukozyten und nicht der Etablierung von Grenzwerten. Sie sind daher eher als Grundlagenforschung zu verstehen, denn als klinischer Wegweiser.

4.1.2 Studie III

Die Limitationen liegen sicherlich vor allem im retrospektiven Design dieser Studie. Für die Dokumentation einer Sonografie bei vermuteter Appendizitis wurde kein standardisiertes Verfahren verwendet. Zudem ist die Fragestellung nach der Differenzierung der Entitäten zur Stratifizierung des Therapiekonzepts noch sehr neu, daher gab es in den wenigsten Befunden überhaupt eine Unterscheidung.

4.1.3 Studie IV

Auch bei dieser Studie handelt es sich um eine retrospektive Datenanalyse. Es wurde versucht dieses Defizit durch die ausschließliche Verwendung von untersucherunabhängigen numerischen Daten auszugleichen. Auch der gemessene Appendix-Durchmesser kann in diese Kategorie gezählt werden, da es nachweislich eine hohe

Konkordanz zwischen Radiologen bezüglich dieses Parameters gibt. Aufgrund des retrospektiven Charakters können wir keinen klinisch verwendbaren Algorithmus liefern, allerdings können wir signifikant bessere diagnostische Möglichkeiten demonstrieren, die eine sichere Übertragung auf den klinischen Alltag versprechen.

4.2 Ausblick

4.2.1 Genexpressionsanalyse

Die hier vorgelegten Studien zusammengenommen mit den bereits erwähnten immunologischen Studien von Rubér et al. legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den unterschiedlichen Entitäten der akuten Appendizitis um pathophysiologisch zu distinguierende Erkrankungen handelt, die auf unterschiedlichen immunologischen Mustern basieren (Rubér et al., 2006, Rubér et al., 2010, Rivera-Chavez et al., 2004).

Zur Identifizierung der unterliegenden Gensequenzen wurden bereits Blutgruppen in der Rettungsstelle von Patienten mit vermuteter akuter Appendizitis (Gruppe 1: unkomplizierte Appendizitis, Gruppe 2: komplizierte Appendizitis) gesammelt. Anschließend wurden die Leukozyten durch Zentrifugation aus den Proben filtriert und schockgefroren. Der nächste Schritt ist die Microarray-Analyse zur genomweiten Genexpressionsanalyse zur Identifizierung von mRNA, die auf mögliche differenzierende Markerproteine hinweisen. In einem weiteren Schritt werden Expressionsanalysen dieser Gene bei Patienten beider Gruppen durchgeführt. Dabei würde es sich zunächst um eine prospektive Untersuchung ohne Therapierelevanz handeln. Anschließend wäre es im Falle einer Identifizierung von Markerproteinen möglich, Patienten mit Verdacht auf akute Appendizitis in der Rettungsstelle prospektiv hinsichtlich des diagnostischen Wertes der Marker für die Unterscheidung von komplizierter und unkomplizierter Appendizitis zu untersuchen.

Das Fernziel wäre es, Patienten in der Rettungsstelle mit Verdacht auf eine akute Appendizitis entsprechend der Vorhersageparameter behandeln zu können. Somit würden nur noch die Patienten mit einer hohen Komplikationswahrscheinlichkeit sich den Risiken einer Operation unterziehen müssen. Dies wäre im Sinne der Risikostratifikation und monetärer Ressourcen erstrebenswert.

4.2.2 Standardisierung der Ultraschalldiagnostik

Aufgrund der zuvor genannten Limitationen der Studie zur sonografischen Diagnostik der Appendizitis, planten wir eine prospektive Studie zur sonografischen Bildgebung bei Verdacht einer AA mittels standardisierter Dokumentation. Das Design wurde in Kooperation mit der Abteilung für Kinderradiologie erarbeitet, um die praktische Umsetzbarkeit zu gewährleisten. Ziel dieser Studie ist die erweiterte Identifikation von Parametern zur Unterscheidung von komplizierter und unkomplizierter Appendizitis sein. Der Beginn der Studie ist für Oktober 2019 terminiert.

5 Literaturverzeichnis

- ADDISS, D. G., SHAFFER, N., FOWLER, B. S. & TAUXE, R. V. 1990. The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the United States. *Am J Epidemiol*, 132, 910-25.
- AKDIS, M., BURGLER, S., CRAMERI, R., EIWEGGER, T., FUJITA, H., GOMEZ, E., KLUNKER, S., MEYER, N., O'MAHONY, L., PALOMARES, O., RHYNER, C., OUAKED, N., SCHAFFARTZIK, A., VAN DE VEEN, W., ZELLER, S., ZIMMERMANN, M. & AKDIS, C. A. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 127, 701-21 e1-70.
- ALMSTROM, M., SVENSSON, J. F., PATKOVA, B., SVENNINGSSON, A. & WESTER, T. 2017. In-hospital Surgical Delay Does Not Increase the Risk for Perforated Appendicitis in Children: A Single-center Retrospective Cohort Study. *Ann Surg*, 265, 616-621.
- ANDERSSON, R., HUGANDER, A., THULIN, A., NYSTROM, P. O. & OLAISSON, G. 1994. Indications for operation in suspected appendicitis and incidence of perforation. *BMJ*, 308, 107-10.
- ANDERSSON, R. E. 2004. Meta-analysis of the clinical and laboratory diagnosis of appendicitis. *Br J Surg*, 91, 28-37.
- ANDERSSON, R. E. & LAMBE, M. 2001. Incidence of appendicitis during pregnancy. *Int J Epidemiol*, 30, 1281-5.
- ANDERSSON, R. E., OLAISSON, G., TYSK, C. & EKBOM, A. 2001. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 344, 808-14.
- ANDERSSON, R. E., OLAISSON, G., TYSK, C. & EKBOM, A. 2003. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 124, 40-6.
- ARAVINDAN, K. P., VIJAYARAGHAVAN, D. & MANIPADAM, M. T. 2010. Acute eosinophilic appendicitis and the significance of eosinophil - Edema lesion. *Indian J Pathol Microbiol*, 53, 258-61.
- BASTA, M., MORTON, N. E., MULVIHILL, J. J., RADOVANOVIC, Z., RADOJICIC, C. & MARINKOVIC, D. 1990. Inheritance of acute appendicitis: familial aggregation and evidence of polygenic transmission. *Am J Hum Genet*, 46, 377-82.
- BATES, M. F., KHANDER, A., STEIGMAN, S. A., TRACY, T. F., JR. & LUKS, F. I. 2014. Use of white blood cell count and negative appendectomy rate. *Pediatrics*, 133, e39-44.
- BEKELE, A. & MEKASHA, A. 2006. Clinical profile and risk factors for perforation of acute appendicitis in children. *East Afr Med J*, 83, 434-9.
- BELTRAN, M. A., ALMONACID, J., VICENCIO, A., GUTIERREZ, J., CRUCES, K. S. & CUMSILLE, M. A. 2007. Predictive value of white blood cell count and C-reactive protein in children with appendicitis. *J Pediatr Surg*, 42, 1208-14.

- BERGHOLZ, R., KLEIN, I., WENKE, K., BOETTCHER, M., REINSHAGEN, K. & KREBS, T. 2015. Midterm outcome of transumbilically laparoscopic-assisted versus laparoscopic and open appendectomy in children--a matched prospective study. *Eur J Pediatr Surg*, 25, 216-9.
- BIRNBAUM, B. A. & WILSON, S. R. 2000. Appendicitis at the millennium. *Radiology*, 215, 337-48.
- BLUMFIELD, E., NAYAK, G., SRINIVASAN, R., MURANAKA, M. T., BLITMAN, N. M., BLUMFIELD, A. & LEVIN, T. L. 2013. Ultrasound for differentiation between perforated and nonperforated appendicitis in pediatric patients. *AJR Am J Roentgenol*, 200, 957-62.
- BONILLA, F. A. & OETTGEN, H. C. 2010. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S33-40.
- BUNDY, D. G., BYERLEY, J. S., LILES, E. A., PERRIN, E. M., KATZNELSON, J. & RICE, H. E. 2007. Does this child have appendicitis? *JAMA*, 298, 438-51.
- CAPPENDIJK, V. C. & HAZEBROEK, F. W. 2000. The impact of diagnostic delay on the course of acute appendicitis. *Arch Dis Child*, 83, 64-6.
- CARPENTER, J. L., ORTH, R. C., ZHANG, W., LOPEZ, M. E., MANGONA, K. L. & GUILLERMAN, R. P. 2017. Diagnostic Performance of US for Differentiating Perforated from Nonperforated Pediatric Appendicitis: A Prospective Cohort Study. *Radiology*, 282, 835-841.
- CARR, N. J. 2000. The pathology of acute appendicitis. *Ann Diagn Pathol*, 4, 46-58.
- CHEONG, L. H. & EMIL, S. 2014. Pediatric laparoscopic appendectomy: a population-based study of trends, associations, and outcomes. *J Pediatr Surg*, 49, 1714-8.
- COMMINS, S. P., BORISH, L. & STEINKE, J. W. 2010. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S53-72.
- DE GRAAFF, J. C., SARFO, M. C., VAN WOLFSWINKEL, L., VAN DER WERFF, D. B. & SCHOUTEN, A. N. 2015. Anesthesia-related critical incidents in the perioperative period in children; a proposal for an anesthesia-related reporting system for critical incidents in children. *Paediatr Anaesth*, 25, 621-9.
- FALLON, S. C., BRANDT, M. L., HASSAN, S. F., WESSON, D. E., RODRIGUEZ, J. R. & LOPEZ, M. E. 2013a. Evaluating the effectiveness of a discharge protocol for children with advanced appendicitis. *J Surg Res*, 184, 347-51.
- FALLON, S. C., HASSAN, S. F., LARIMER, E. L., RODRIGUEZ, J. R., BRANDT, M. L., WESSON, D. E., PALAZZI, D. L. & LOPEZ, M. E. 2013b. Modification of an evidence-based protocol for advanced appendicitis in children. *J Surg Res*, 185, 273-7.
- FALLON, S. C., KIM, M. E., HALLMARK, C. A., CARPENTER, J. L., ELDIN, K. W., LOPEZ, M. E., WESSON, D. E., BRANDT, M. L. & RUBEN RODRIGUEZ, J. 2015. Correlating surgical and pathological diagnoses in pediatric appendicitis. *J Pediatr Surg*, 50, 638-41.
- GALINDO GALLEGO, M., FADRIQUE, B., NIETO, M. A., CALLEJA, S., FERNANDEZ-ACENERO, M. J., AIS, G., GONZALEZ, J. & MANZANARES, J. J. 1998.

- Evaluation of ultrasonography and clinical diagnostic scoring in suspected appendicitis. *Br J Surg*, 85, 37-40.
- GAUDERER, M. W., CRANE, M. M., GREEN, J. A., DECOU, J. M. & ABRAMS, R. S. 2001. Acute appendicitis in children: the importance of family history. *J Pediatr Surg*, 36, 1214-7.
- GONGIDI, P. & BELLAH, R. D. 2017. Ultrasound of the pediatric appendix. *Pediatr Radiol*, 47, 1091-1100.
- GOSEMANN, J. H., LANGE, A., ZEIDLER, J., BLASER, J., DINGEMANN, C., URE, B. M. & LACHER, M. 2016. Appendectomy in the pediatric population-a German nationwide cohort analysis. *Langenbecks Arch Surg*, 401, 651-9.
- GRONROOS, J. M. & GRONROOS, P. 1999. Leucocyte count and C-reactive protein in the diagnosis of acute appendicitis. *Br J Surg*, 86, 501-4.
- HALL, N. J., EATON, S., ABBO, O., ARNAUD, A. P., BEAUDIN, M., BRINDLE, M., BUTTER, A., DAVIES, D., JANCELEWICZ, T., JOHNSON, K., KEIJZER, R., LAPIDUS-KROL, E., OFFRINGA, M., PICHE, N., RINTALA, R., SKARSGARD, E., SVENSSON, J. F., UNGAR, W. J., WESTER, T., WILLAN, A. R., ZANI, A., ST PETER, S. D. & PIERRO, A. 2017. Appendectomy versus non-operative treatment for acute uncomplicated appendicitis in children: study protocol for a multicentre, open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *BMJ Paediatr Open*, 1.
- HANSSON, J., KORNER, U., KHORRAM-MANESH, A., SOLBERG, A. & LUNDHOLM, K. 2009. Randomized clinical trial of antibiotic therapy versus appendectomy as primary treatment of acute appendicitis in unselected patients. *Br J Surg*, 96, 473-81.
- HSIEH, C. H., LU, R. H., LEE, N. H., CHIU, W. T., HSU, M. H. & LI, Y. C. 2011. Novel solutions for an old disease: diagnosis of acute appendicitis with random forest, support vector machines, and artificial neural networks. *Surgery*, 149, 87-93.
- HUMES, D. J. & SIMPSON, J. 2006. Acute appendicitis. *BMJ*, 333, 530-4.
- KESSLER, N., CYTEVAL, C., GALLIX, B., LESNIK, A., BLAYAC, P. M., PUJOL, J., BRUEL, J. M. & TAOUREL, P. 2004. Appendicitis: evaluation of sensitivity, specificity, and predictive values of US, Doppler US, and laboratory findings. *Radiology*, 230, 472-8.
- KIM, M. S., PARK, H. W., PARK, J. Y., PARK, H. J., LEE, S. Y., HONG, H. P., KWAG, H. J. & KWON, H. J. 2014. Differentiation of early perforated from nonperforated appendicitis: MDCT findings, MDCT diagnostic performance, and clinical outcome. *Abdom Imaging*, 39, 459-66.
- LAMPS, L. W. 2010. Infectious causes of appendicitis. *Infect Dis Clin North Am*, 24, 995-1018, ix-x.
- LEE, J. H., JEONG, Y. K., PARK, K. B., PARK, J. K., JEONG, A. K. & HWANG, J. C. 2005. Operator-dependent techniques for graded compression sonography to detect the appendix and diagnose acute appendicitis. *AJR Am J Roentgenol*, 184, 91-7.
- LEE, S. L., WALSH, A. J. & HO, H. S. 2001. Computed tomography and ultrasonography do not improve and may delay the diagnosis and treatment of acute appendicitis. *Arch Surg*, 136, 556-62.

- LI, X., ZHANG, J., SANG, L., ZHANG, W., CHU, Z., LI, X. & LIU, Y. 2010. Laparoscopic versus conventional appendectomy--a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Gastroenterol*, 10, 129.
- MAHIDA, J. B., LODWICK, D. L., NACION, K. M., SULKOWSKI, J. P., LEONHART, K. L., COOPER, J. N., AMBEBA, E. J., DEANS, K. J. & MINNECI, P. C. 2016. High failure rate of nonoperative management of acute appendicitis with an appendicolith in children. *J Pediatr Surg*, 51, 908-11.
- MALIK, A. A. & BARI, S. U. 2009. Conservative management of acute appendicitis. *J Gastrointest Surg*, 13, 966-70.
- OHMANN, C., FRANKE, C., KRAEMER, M. & YANG, Q. 2002. [Status report on epidemiology of acute appendicitis]. *Chirurg*, 73, 769-76.
- PAAJANEN, H., GRONROOS, J. M., RAUTIO, T., NORDSTROM, P., AARNIO, M., RANTANEN, T., HURME, S., DEAN, K., JARTTI, A., MECKLIN, J. P., SAND, J. & SALMINEN, P. 2013. A prospective randomized controlled multicenter trial comparing antibiotic therapy with appendectomy in the treatment of uncomplicated acute appendicitis (APPAC trial). *BMC Surg*, 13, 3.
- PARK, S. H. & HAN, K. 2018. Methodologic Guide for Evaluating Clinical Performance and Effect of Artificial Intelligence Technology for Medical Diagnosis and Prediction. *Radiology*, 286, 800-809.
- PEARL, R. H., HALE, D. A., MOLLOY, M., SCHUTT, D. C. & JAQUES, D. P. 1995. Pediatric appendectomy. *J Pediatr Surg*, 30, 173-8; discussion 178-81.
- PECARIC-PETKOVIC, T., DIDICHENKO, S. A., KAEMPFER, S., SPIEGL, N. & DAHINDEN, C. A. 2009. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*, 113, 1526-34.
- PELETTI, A. B. & BALDISSEROTTO, M. 2006. Optimizing US examination to detect the normal and abnormal appendix in children. *Pediatr Radiol*, 36, 1171-6.
- RENTEA, R. M., PETER, S. D. S. & SNYDER, C. L. 2017. Pediatric appendicitis: state of the art review. *Pediatr Surg Int*, 33, 269-283.
- RIVERA-CHAVEZ, F. A., PETERS-HYBKI, D. L., BARBER, R. C., LINDBERG, G. M., JIALAL, I., MUNFORD, R. S. & O'KEEFE, G. E. 2004. Innate immunity genes influence the severity of acute appendicitis. *Ann Surg*, 240, 269-77.
- ROMANO, A., PARIKH, P., BYERS, P. & NAMIAS, N. 2014. Simple acute appendicitis versus non-perforated gangrenous appendicitis: is there a difference in the rate of post-operative infectious complications? *Surg Infect (Larchmt)*, 15, 517-20.
- ROSENBAUM, D. G., ASKIN, G., BENECK, D. M. & KOVANLIKAYA, A. 2017. Differentiating perforated from non-perforated appendicitis on contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Pediatr Radiol*, 47, 1483-1490.
- RUBER, M., ANDERSSON, M., PETERSSON, B. F., OLAISON, G., ANDERSSON, R. E. & EKERFELT, C. 2010. Systemic Th17-like cytokine pattern in gangrenous appendicitis but not in phlegmonous appendicitis. *Surgery*, 147, 366-72.
- RUBER, M., BERG, A., EKERFELT, C., OLAISON, G. & ANDERSSON, R. E. 2006. Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis. *Clin Exp Immunol*, 143, 117-24.

- SACK, U., BIEREDER, B., ELOUAHIDI, T., BAUER, K., KELLER, T. & TROBS, R. B. 2006. Diagnostic value of blood inflammatory markers for detection of acute appendicitis in children. *BMC Surg*, 6, 15.
- SADR AZODI, O., ANDREN-SANDBERG, A. & LARSSON, H. 2009. Genetic and environmental influences on the risk of acute appendicitis in twins. *Br J Surg*, 96, 1336-40.
- SALMINEN, P., PAAJANEN, H., RAUTIO, T., NORDSTROM, P., AARNIO, M., RANTANEN, T., TUOMINEN, R., HURME, S., VIRTANEN, J., MECKLIN, J. P., SAND, J., JARTTI, A., RINTA-KIIKKA, I. & GRONROOS, J. M. 2015. Antibiotic Therapy vs Appendectomy for Treatment of Uncomplicated Acute Appendicitis: The APPAC Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 313, 2340-8.
- SINGH, M., KADIAN, Y. S., RATTAN, K. N. & JANGRA, B. 2014. Complicated appendicitis: analysis of risk factors in children. *Afr J Paediatr Surg*, 11, 109-13.
- SIVIT, C. J., SIEGEL, M. J., APPLGATE, K. E. & NEWMAN, K. D. 2001. When appendicitis is suspected in children. *Radiographics*, 21, 247-62; questionnaire 288-94.
- ST PETER, S. D., SHARP, S. W., HOLCOMB, G. W., 3RD & OSTLIE, D. J. 2008. An evidence-based definition for perforated appendicitis derived from a prospective randomized trial. *J Pediatr Surg*, 43, 2242-5.
- STYRUD, J., ERIKSSON, S., NILSSON, I., AHLBERG, G., HAAPANIEMI, S., NEOVIUS, G., REX, L., BADUME, I. & GRANSTROM, L. 2006. Appendectomy versus antibiotic treatment in acute appendicitis. a prospective multicenter randomized controlled trial. *World J Surg*, 30, 1033-7.
- SUNG, T., CALLAHAN, M. J. & TAYLOR, G. A. 2006. Clinical and imaging mimickers of acute appendicitis in the pediatric population. *AJR Am J Roentgenol*, 186, 67-74.
- SVENSSON, J. 2016. Antibiotic treatment of appendicitis. *J Pediatr*, 176, 221-4.
- SVENSSON, J. F., HALL, N. J., EATON, S., PIERRO, A. & WESTER, T. 2012. A review of conservative treatment of acute appendicitis. *Eur J Pediatr Surg*, 22, 185-94.
- SVENSSON, J. F., PATKOVA, B., ALMSTROM, M., NAJI, H., HALL, N. J., EATON, S., PIERRO, A. & WESTER, T. 2015. Nonoperative treatment with antibiotics versus surgery for acute nonperforated appendicitis in children: a pilot randomized controlled trial. *Ann Surg*, 261, 67-71.
- TIBONI, S., BHANGU, A., HALL, N. J., PAEDIATRIC SURGERY TRAINEES RESEARCH, N. & THE NATIONAL SURGICAL RESEARCH, C. 2014. Outcome of appendicectomy in children performed in paediatric surgery units compared with general surgery units. *Br J Surg*, 101, 707-14.
- TULIN-SILVER, S., BABB, J., PINKNEY, L., STRUBEL, N., LALA, S., MILLA, S. S., TOMITA, S. & FEFFERMAN, N. R. 2015. The challenging ultrasound diagnosis of perforated appendicitis in children: constellations of sonographic findings improve specificity. *Pediatr Radiol*, 45, 820-30.
- VON SCHWEINITZ, D. & URE, B. 2009. Appendicitis. *Kinderchirurgie : viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters*. Heidelberg: Springer-Medizin-Verlag.
- VONS, C., BARRY, C., MAITRE, S., PAUTRAT, K., LECONTE, M., COSTAGLIOLI, B., KAROUI, M., ALVES, A., DOUSSET, B., VALLEUR, P., FALISSARD, B. &

- FRANCO, D. 2011. Amoxicillin plus clavulanic acid versus appendicectomy for treatment of acute uncomplicated appendicitis: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*, 377, 1573-9.
- WEI, P. L., CHEN, C. S., KELLER, J. J. & LIN, H. C. 2012. Monthly variation in acute appendicitis incidence: a 10-year nationwide population-based study. *J Surg Res*, 178, 670-6.
- WILMS, I. M., DE HOOG, D. E., DE VISSER, D. C. & JANZING, H. M. 2011. Appendectomy versus antibiotic treatment for acute appendicitis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008359.
- XU, Y., JEFFREY, R. B., CHANG, S. T., DIMAIO, M. A. & OLCOTT, E. W. 2017. Sonographic Differentiation of Complicated From Uncomplicated Appendicitis: Implications for Antibiotics-First Therapy. *J Ultrasound Med*, 36, 269-277.
- ZIELKE, A. 2002. [Appendicitis. Present-day diagnosis]. *Chirurg*, 73, 782-90.
- ZIELKE, A., SITTER, H., RAMPP, T., BOHRER, T. & ROTHMUND, M. 2001. Clinical decision-making, ultrasonography, and scores for evaluation of suspected acute appendicitis. *World J Surg*, 25, 578-84.

6 Publikationen

6.1 Studie I:

Minderjahn M, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M.: Phlegmonous appendicitis is characterized by eosinophilia in white blood cells counts. *World J Pediatr.* 2018 Oct;14(5):504-509. Epub 2018 Jul 24

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12519-018-0173-3>.

6.2 Studie II:

Reismann J, Schädlich D, **Minderjahn MI**, Rothe K, Reismann M.: Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int.* 2019 Mar;35(3): 335-340. Epub 2018 Dec 7.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00383-018-4423-1>

6.3 Studie III

Rawolle T, Reismann M, **Minderjahn MI**, Bassir C, Hauptmann K, Rothe K, Reismann J. Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated pediatric appendicitis: Correlations between ultrasound findings and histological results. Br J Radiol. 2019 Jul;92(1099):20190102. Epub 2019 May 29

DOI: <https://doi.org/10.1259/bjr.20190102>

6.4 Studie IV

RESEARCH ARTICLE

Diagnosis and classification of pediatric acute appendicitis by artificial intelligence methods: An investigator-independent approach

Josephine Reismann¹, Alessandro Romualdi², Natalie Kiss¹, Maximiliane I. Minderjahn¹, Jim Kallarackal², Martina Schad², Marc Reismann^{1*}

1 Department of Pediatric Surgery, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz, Berlin, Germany, **2** OakLabs GmbH, Hennigsdorf, Germany

* marc.reismann@charite.de



Abstract

Acute appendicitis is one of the major causes for emergency surgery in childhood and adolescence. Appendectomy is still the therapy of choice, but conservative strategies are increasingly being studied for uncomplicated inflammation. Diagnosis of acute appendicitis remains challenging, especially due to the frequently unspecific clinical picture. Inflammatory blood markers and imaging methods like ultrasound are limited as they have to be interpreted by experts and still do not offer sufficient diagnostic certainty. This study presents a method for automatic diagnosis of appendicitis as well as the differentiation between complicated and uncomplicated inflammation using values/parameters which are routinely and unbiasedly obtained for each patient with suspected appendicitis. We analyzed full blood counts, c-reactive protein (CRP) and appendiceal diameters in ultrasound investigations corresponding to children and adolescents aged 0–17 years from a hospital based population in Berlin, Germany. A total of 590 patients (473 patients with appendicitis in histopathology and 117 with negative histopathological findings) were analyzed retrospectively with modern algorithms from machine learning (ML) and artificial intelligence (AI). The discovery of informative parameters (biomarker signatures) and training of the classification model were done with a maximum of 35% of the patients. The remaining minimum 65% of patients were used for validation. At clinical relevant cut-off points the accuracy of the biomarker signature for diagnosis of appendicitis was 90% (93% sensitivity, 67% specificity), while the accuracy to correctly identify complicated inflammation was 51% (95% sensitivity, 33% specificity) on validation data. Such a test would be capable to prevent two out of three patients without appendicitis from useless surgery as well as one out of three patients with uncomplicated appendicitis. The presented method has the potential to change today's therapeutic approach for appendicitis and demonstrates the capability of algorithms from AI and ML to significantly improve diagnostics even based on routine diagnostic parameters.

OPEN ACCESS

Citation: Reismann J, Romualdi A, Kiss N, Minderjahn MI, Kallarackal J, Schad M, et al. (2019) Diagnosis and classification of pediatric acute appendicitis by artificial intelligence methods: An investigator-independent approach. PLoS ONE 14(9): e0222030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030>

Editor: Pascal A. T. Baltzer, Medical University of Vienna, AUSTRIA

Received: May 1, 2019

Accepted: August 20, 2019

Published: September 25, 2019

Copyright: © 2019 Reismann et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data can be found at the Open Science framework (www.osf.io) under the URL <https://osf.io/9wvys>.

Funding: The authors received no specific funding for this work. Dr. Martina Schad and Dr. Jim Kallarackal are both owners of the OakLabs GmbH. They have been involved in the study design, data analysis, decision to publish, and preparation of the manuscript. Alessandro Romualdi is an employee of OakLabs GmbH. OakLabs GmbH provided

support in the form of salary for author AR, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing interests: We have the following interests: Dr. Martina Schaad and Dr. Jim Kallarackal are both owners of the OakLabs GmbH. Alessandro Romualdi is an employee of OakLabs GmbH. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Acute appendicitis is one of the most common causes for emergency surgery with a lifetime risk between 7 and 9% in industrialized countries. Especially children are affected with a peak incidence in adolescence [1]. Correct diagnosis of appendicitis is still a challenge. Especially clinical decision making is difficult due to great differences between investigators. Published sensitivity values for frequently favored clinical signs like right lower quadrant pain vary between 49% (specificity 73%) and 69% (specificity 61%) [2, 3].

Although individual concepts vary, there is broad consensus on basic diagnostic measures in cases of suspected acute appendicitis. Suspicion of acute appendicitis is usually based on clinical presentation and patient's history. Further laboratory diagnostics include white blood cell counts, absolute neutrophil count and C-reactive protein (CRP). Routine diagnostic is usually completed by imaging studies like ultrasound, computed tomography or magnetic resonance imaging [4].

Single laboratory values such as neutrophil and leucocyte counts as well as increased C-reactive protein (CRP) provide diagnostic value: sensitivities for the latter range between 38 and 70% (specificities 85 and 65%, respectively) [5, 6]. In two recent publications including the herein reported 590 patients we analyzed possible constitutive differences between complicated and uncomplicated appendicitis with regard to cellular subpopulations in white blood cell counts and CRP: Significant and time stable differences were found [7, 8]. Especially relative eosinophilia in patients with uncomplicated appendicitis was remarkable. The investigation did not go beyond a statistical analysis of the individual parameters and the discriminatory capacity of the single parameters was low.

The appendiceal diameter, an unbiased and even in children age-independent measurement value, has previously shown to provide a high sensitivity to diagnose appendicitis in adults with an accuracy of 79% [6, 7]. In a recently published study, including the 590 patients of the present study, we have shown that ultrasound has also value for the differentiation of complicated from uncomplicated appendicitis [9]. The appendix could be sonographically visualized in a clear majority of 862 out of 1017 included patients (85%). Other parameters such as blood values were not the subject of the statistical analysis.

Further ambitions of improving the diagnosis of appendicitis in adults focus on modeling multiple parameters, including clinical and laboratory ones [10].

However, in children, especially with an age below six years, clinical signs and symptoms are less reliable. Clinically complicated appendicitis in this age group is frequently hard to differentiate—especially from gastroenteritis [11].

Clinically based scores such as the Alvaro Score and the Pediatric Appendicitis Score (PAS) have been described as potential tools for identifying children with appendicitis. However, reported sensitivities and respective specificities are marked by an extensive variability [11]. A key problem is probably the low interobserver reliability of predictor variables [10].

The aim of the present study was to establish a model for decision making for suspected acute appendicitis in children, which is based on reliable non-clinical parameters unbiased from interpretation or expert opinion: counts of cell types in whole blood, CRP values and the appendiceal diameter as a simple sonographic numerical measure.

A special focus was the differentiation between uncomplicated (phlegmonous) and complicated (gangrenous/perforated) appendicitis. Early diagnosis of complicated inflammation is particularly important, because this severe type of disease primarily requires surgical treatment. In contrast, for uncomplicated appendicitis conservative strategies are under investigation and will most probably be primarily applied in the near future, as shown by a current multicenter randomized controlled trial [12].

Though correlations between cellular compartments in full blood and the type of disease have been shown previously [7, 8], the diagnosis of complicated appendicitis remains challenging. With the study we also strived to demonstrate the feasibility of a multi-parameter model for the differential diagnosis of appendicitis.

Materials and methods

Study population

We present a single-center, retrospective study of patients aged 0–17 years who underwent surgery for suspected acute appendicitis at the Department of Pediatric Surgery of Charité - Universitätsmedizin Berlin between December 2006 and September 2016. The study was approved by our institutional review board and the ethical committee (reference number EA2/169/18).

Medical charts of all patients who were operated for suspected acute appendicitis were reviewed for gender, age and standard diagnostic parameters: CRP values, cell counts in full blood, histopathologies and ultrasound findings. Exclusion criteria were missing histopathologies or laboratory values, concomitant chronic disease, secondary or elective appendectomy and other pathologies of the appendix like oxyuriasis and carcinoid.

Histopathological classification

Histopathological analyses were retrospectively reviewed to classify the patients into three groups: uncomplicated (phlegmonous) appendicitis, complicated (gangrenous/perforated) appendicitis and normal appendix (negative for appendicitis). In clinical settings the histological finding of phlegmonous appendicitis is associated with uncomplicated courses (UA), whereas gangrenous appendicitis and perforation are categorized as acute complicated appendicitis (CA) [13, 14]. Uncomplicated phlegmonous appendicitis was defined by transmural neutrophilic infiltration of the appendix without signs of gangrene or perforation. Gangrenous appendicitis was characterized by ischemic areas leading to transmural myonecrosis leading possibly to perforation with presence of a transmural defect [15].

Laboratory data

Routinely performed white blood cell counts included the following mature leukocyte subpopulations: eosinophil granulocytes (eosinophils), neutrophil granulocytes (neutrophils), lymphocytes, basophilic granulocytes (basophils), and monocytes supplemented by thrombocytes and C-reactive protein (CRP) at time of hospital admission.

Sonography

All included sonographic measures had been routinely performed by pediatric radiologists within the first presentation of the patients in the emergency department. All reported ultrasound examinations were performed or directly supervised by four experienced consultant pediatric radiologists with sonographic experience of at least 19 up to 37 years. The appendix was measured from outer wall to outer wall [16, 17]. Fig 1 shows exemplary pictures of appendices without and with uncomplicated phlegmonous as well as with complicated gangrenous appendicitis.

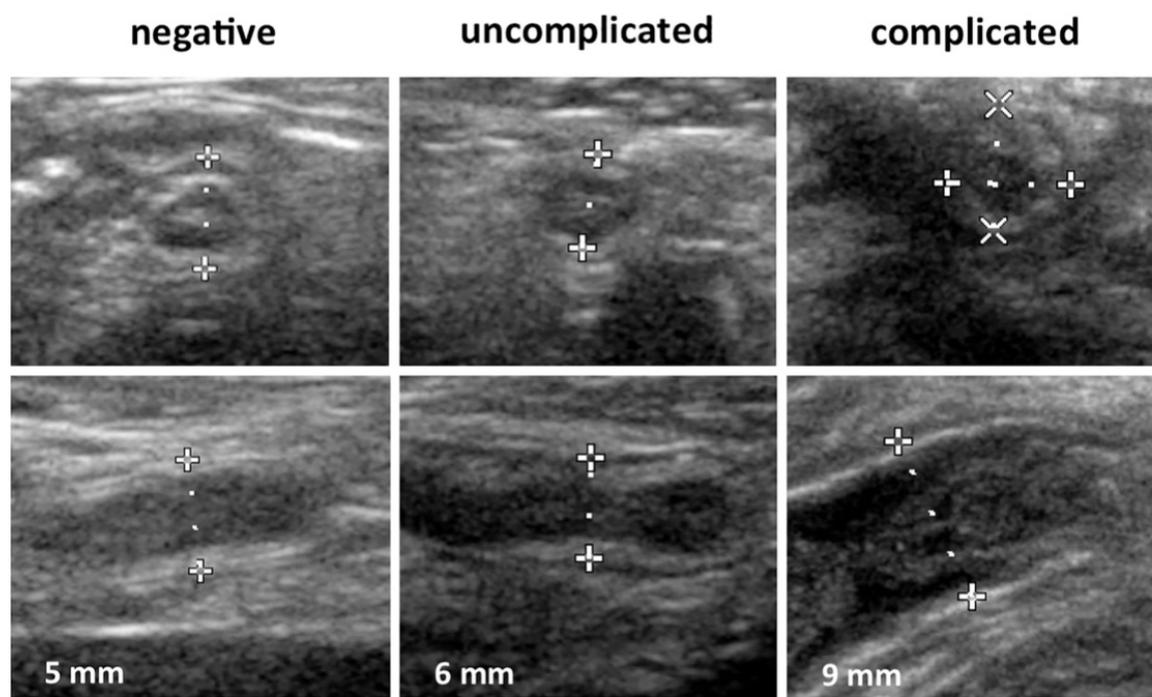


Fig 1. Sonographic images of appendices from 8 years old female patients without inflammation, with uncomplicated and with complicated appendicitis; cross and longitudinal sections, respective maximum diameters [mm].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030.g001>

Development and validation of biomarker signatures for diagnosis of appendicitis

A supervised learning algorithm is used to analyze laboratory data and to build a prediction model for diagnosis of appendicitis based on relevant biomarkers. This is a two-step process summarized as *discovery* and *validation*. The model building and biomarker selection was performed on a portion of the available sample data denominated as “discovery set”; the performance of the final model was measured in a distinct data set denominated as “validation”. The input data consisted of n samples, each described by a set of p variables, represented by the biomarker values. Concretely, we had a data matrix X consisting of n lines and p columns.

In the discovery phase, we identified relevant biomarkers: we first built a sequence of distinct biomarker signatures $\{bm_1, \dots, bm_p, \dots, bm_m\}$ and then implement a binary classification problem fitting the parameters of a linear model on the discovery data $X_{\text{discovery}}$, whose columns p_{bm_j} were filtered according to the biomarker signatures. The parameters of the linear model were optimized with the Limited-memory BFGS (LBFGS) algorithm [18]. Since the two classes (‘complicated’ + ‘uncomplicated’/ ‘negative’) were highly imbalanced with respect to sample sizes, the learning mistakes relative to the class with larger sample number were penalized with a weight coefficient during the optimization process. In this way, the quality of each biomarker signature was measured with the cross-validation accuracy on the discovery data.

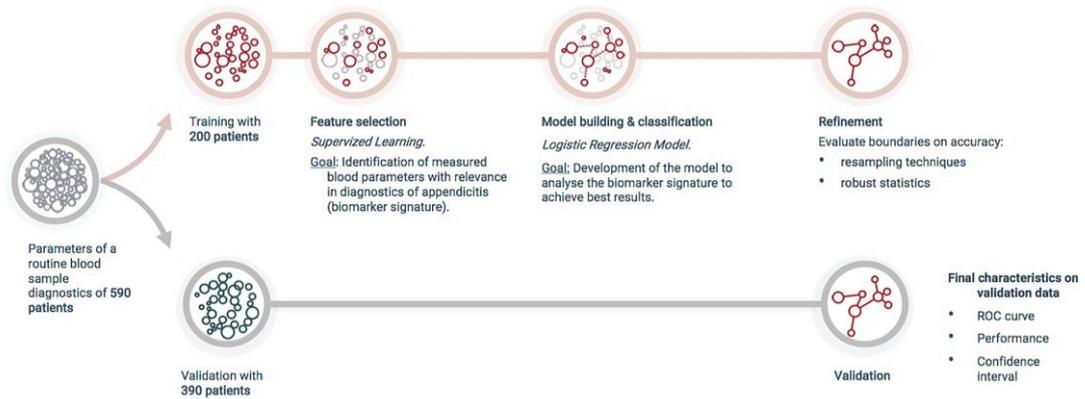


Fig 2. Illustration of development and validation of biomarker signatures.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030.g002>

All performance values denoted here were obtained measuring the performance of the trained obtained model, on the validation data $X_{validation}$.

Out of a total of 1102 patients, 590 patients with availability of the required histological, laboratory and sonographic parameters were used for the discovery and validation process. We aimed to selectively investigate the influence of the sonographic parameter within the signature. For diagnosing appendicitis, 390 patients were used for validation of the signature, which was exclusively based on lab parameters, while 350 patients were used for validation of the signature with the additional parameter from sonography. For the differentiation between complicated and uncomplicated appendicitis, 298 patients were used for validation. The validation set contained a portion of patients which were diagnosed negative for appendicitis to take the false positive rate of the signature for diagnosing appendicitis into account and simulate real-world clinical practice: The complicated appendicitis must be discriminated from uncomplicated appendicitis and negative findings.

Fig 2 illustrates the development and validation of biomarker signatures for the example of appendicitis diagnostics. Respective patient numbers and epidemiological data are shown in Tables 1 and 2.

ROC analysis

Once the best model has been defined with the fitted coefficients, it can be used to predict the *diagnostic status* of a patient with class probability [19].

The output class probabilities may be interpreted as different separation thresholds between class prediction. Each threshold is a trade-off for the model to predict a number of true/false positives and true/false negatives.

Table 1. Numbers and characteristics of patients for development of specific biomarker signatures: Diagnosis of acute appendicitis.

	number	age [years]	gender ♂ / ♀ [total no / %]	negative [total no / %]	uncomplicated [total no / %]	complicated [total no / %]
discovery	200	10.2 ± 4.4	103 (51.5%) / 97 (48.5%)	59 (29.5%)	76 (38%)	65 (32.5%)
validation	390	10.7 ± 3.1	221(56.6%) / 169 (43.3%)	58 (14.9%)	214 (54.9%)	118 (30.2%)
total	590	10.5 ± 3.6	323 (54.7%) / 267 (45.3%)	117 (19.8%)	290 (49.2%)	183 (31%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030.t001>

Table 2. Numbers and characteristics of patients for development of specific biomarker signatures: Detection of complicated appendicitis.

	number	age [years]	gender ♂ / ♀ [total no / %]	negative [total no / %]	uncomplicated [total no / %]	complicated [total no / %]
discovery	192	9.1 ± 3.6	109 (56.8%) / 83 (43.2%)	-	101 (52.6%)	91 (47.4%)
validation	298	10.9 ± 3.2	173 (58%) / 125 (42%)	21 (7%)	186 (62.4%)	91 (30.5%)
total	490	10 ± 4.8	283 (57.8%) / 207 (42.2%)	21 (4.3%)	287 (58.5%)	182 (37.1%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030.t002>

The diagnostic ability of the model (sensitivity and specificity) was tested on the validation set, counting the predicted true positive/false positive rate at different thresholds. The result is illustrated with a Receiver Operating Characteristic (ROC) plot.

Within the ROC analysis, the results of the signatures were compared to those of established laboratory parameters: CRP, leukocyte and neutrophil counts. For comparison, cut-off points were selected which we considered to be of clinical interest [20], that is a sensitivity above 90%. This was reached at the cut-off point of 67% specificity for the diagnosis of acute appendicitis and of 33% specificity for differentiation between complicated and uncomplicated appendicitis. Errors were calculated performing bootstrap resampling.

Results

The distribution of analyzed values for whole blood cell counts, CRP and appendiceal diameter differed between patients with and without appendicitis and between patients with complicated and uncomplicated inflammation, respectively (S1 Fig).

Based on the ten parameters CRP, thrombocytes, leukocytes, neutrophils, eosinophils, basophils and immature granulocytes, lymphocytes and monocytes as well as the appendiceal diameter, two biomarker signatures were developed containing the most informative parameters to diagnose appendicitis and complicated appendicitis, respectively.

For the diagnosis of appendicitis, a selective biomarker signature was developed containing basophils, leukocytes, monocytes, neutrophils, CRP and the appendiceal diameter. For the differential diagnosis of complicated versus uncomplicated appendicitis, a selective biomarker signature was developed including basophils, eosinophils, monocytes, thrombocytes, CRP, supplemented by the appendiceal diameter.

The diagnostic capacities of the developed biomarker signatures were compared to single widely accepted values for diagnostics of acute appendicitis: CRP, leukocytes, neutrophils and appendiceal diameter. Fig 3 shows the results of the respective analysis. ROC curves for diagnosis of acute appendicitis and complicated appendicitis demonstrate increased areas under the curve (AUCs) (Fig 3A and 3D). At selected cut-off points, the properties of the biomarker signatures were compared to those for CRP, leukocytes and neutrophils (Fig 3B, 3C, 3E and 3F). For both diagnostic applications the properties of the biomarker signatures outperform those of the conventional single lab values. Tables 3 and 4 show the exact values for AUCs as well as properties at the cut-off points.

While the appendiceal diameter is fundamental for the diagnostic ability of the analyzed signature (AUC 0.9 with appendiceal diameter vs. 0.8 without), the diameter did not significantly alter the diagnostic capacity for differentiation of complicated appendicitis (AUC 0.81 vs. 0.80) (S2 Fig). Apparently, this sonographic parameter does not reveal a significant predictive capacity as soon as appendicitis has been diagnosed.

Discussion

Though appendicitis is one of the major causes for emergency surgery, its correct diagnosis remains challenging. In this study, we have developed a biomarker signature based on routine

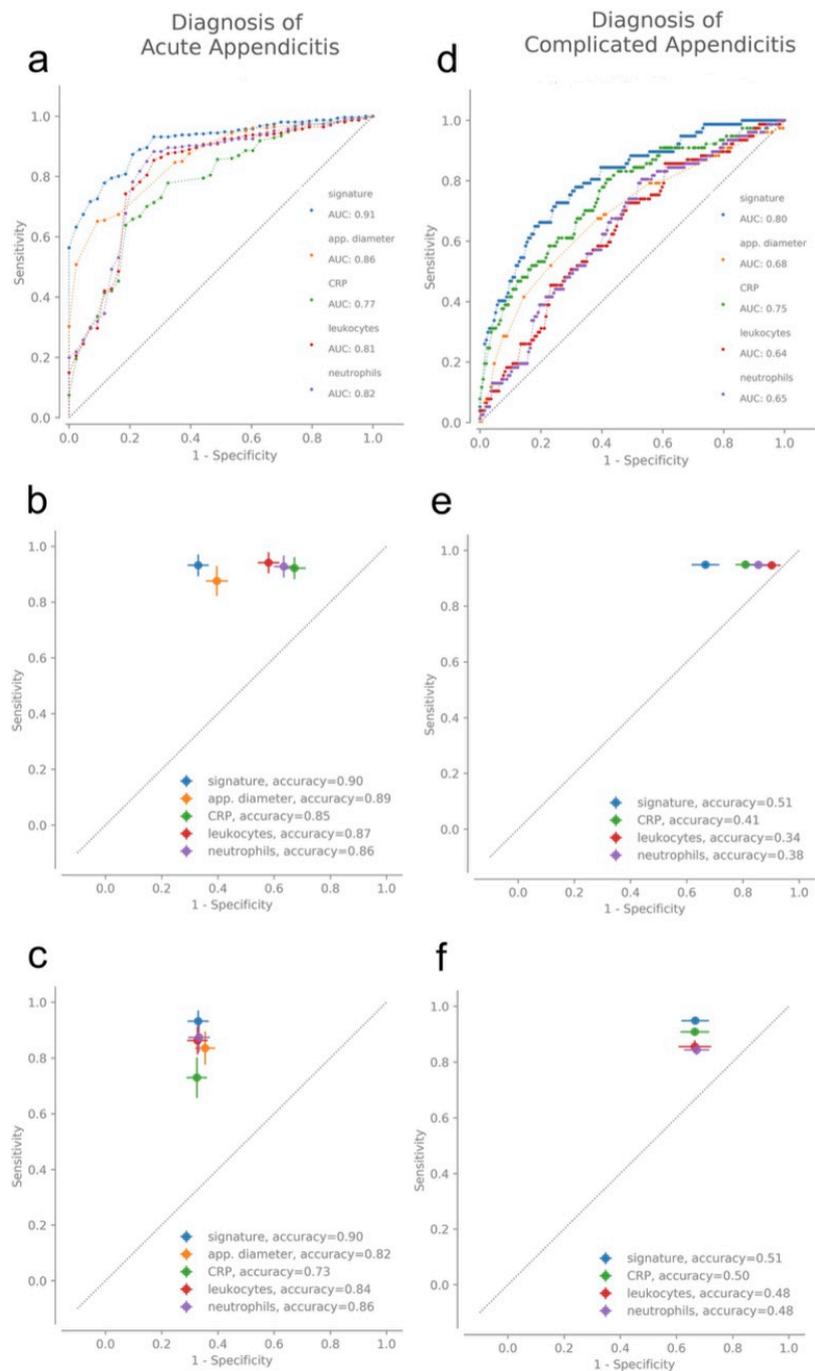


Fig 3. ROC curves. a: analysis of the predictive capacity for discrimination between appendicitis and normal appendix (biomarker signature vs. conventional values CRP, neutrophils, leukocytes and appendiceal diameter). b and c: best cut-off biomarker signature vs. respective sensitivities (b) and specificities (c) of conventional lab values. d: analysis of the diagnostic capacity for discrimination between complicated and uncomplicated appendicitis (biomarker signature vs. conventional values CRP, neutrophils and leukocytes). e and f: best cut-off biomarker signature vs. respective sensitivities (e) and specificities (f) of conventional values. AUCs and accuracies are shown in Tables 3 and 4.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030.g003>

unbiased parameters that is capable of becoming the gold standard for the diagnosis of appendicitis. A second objective was to demonstrate that a multi-parameter model is capable of discriminating between complicated and uncomplicated appendicitis. This is a prerequisite for establishing a modern medical treatment for appendicitis to the patients' benefit.

To avoid methodological weaknesses, we rigorously separated the discovery set from the validation set to be able to determine the value of the outcome. We have chosen a linear model as the initial histograms revealed that the data is linearly separable. A more complex model would potentially fit an excess of parameters to the specifics of the one clinical site which, in turn, would result in low reproducibility. Out of all measured values, two biomarker signatures with clinical relevance were selected by the linear model for discriminating patients with appendicitis from those without, and of patients with complicated from those with uncomplicated inflammation. We have compared the results of the biomarker signatures with the widely used inflammatory values white blood cell counts, CRP and leucocytes within our model: Sensitivities, specificities, accuracies and AUCs of the traditional values were exceeded by those of the linear model.

Imaging techniques are most valuable when acute appendicitis is suspected and have been described as superior to patient history, physical examination, laboratory findings or scores [10, 21]. Regarding sonography, the appendiceal diameter is a very useful discriminating parameter [16, 17]. Furthermore, it is largely independent of personal interpretation. We confirmed the independence of the appendiceal diameter from the age as described previously [16] and included this parameter as an input variable into the linear model. Out of the cellular subpopulations in the white blood cell counts and the appendiceal diameters of the included patients a biomarker signature was developed. At a specificity of 67% and a sensitivity of 93%, an accuracy of 90% is reached on validation data. Such a diagnostic test could prevent two of three patients without appendicitis from appendectomy.

The superiority of our approach for diagnosing appendicitis is reached by combining complementary methods: lab measured values and a value measured by a radiologist, the

Table 3. Areas under the curve (AUC) of ROC curve shown in Fig 3A; accuracies of biomarker signatures and of conventional single markers with respect to sensitivity and specificity levels at selected points for diagnosis of an acute appendicitis with the biomarker signature (sensitivity 0.93, specificity 0.67; Fig 3A–3C).

Biomarker	AUC (Fig 3A)	Specificity at targeted sensitivity of 0.93 [95% CI] (Fig 3B)	Accuracy at targeted sensitivity of 0.93 (Fig 3B)	Sensitivity at targeted specificity of 0.67 [95% CI] (Fig 3C)	Accuracy at targeted specificity of 0.67 (Fig 3C)
signature	0.91	0.67 [0.59–0.74]	0.90	0.93 [0.85–1.00]	0.90
appendiceal diameter	0.86	0.61 [0.53–0.67]	0.89	0.83 [0.72–0.94]	0.82
CRP	0.77	0.33 [0.24–0.40]	0.85	0.73 [0.59–0.85]	0.73
leukocytes	0.81	0.42 [0.35–0.5]	0.87	0.86 [0.76–0.94]	0.84
neutrophils	0.82	0.37 [0.30–0.41]	0.86	0.87 [0.76–0.97]	0.86

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030.t003>

Table 4. Areas under the curve (AUC) of ROC curve shown in Fig 3D; accuracies of biomarker signatures and of conventional single markers with respect to sensitivity and specificity levels at selected points for differentiation from complicated appendicitis with the biomarker signature (sensitivity 0.95, specificity 0.33; Figs d-f).

Biomarker	AUC (Fig 3D)	Specificity at targeted sensitivity of 0.95 [95% CI] (Fig 3E)	Accuracy at targeted sensitivity of 0.95 (Fig 3E)	Sensitivity at targeted specificity of 0.33 [95% CI] (Fig 3F)	Accuracy at targeted specificity of 0.33 (Fig 3F)
signature	0.80	0.33 [0.24–0.42]	0.51	0.95 [0.93–0.97]	0.51
CRP	0.75	0.19 [0.12–0.26]	0.41	0.91 [0.88–0.93]	0.5
leukocytes	0.64	0.1 [0.3–0.16]	0.34	0.86 [0.82–0.90]	0.48
neutrophils	0.65	0.14 [0.8–0.24]	0.38	0.84 [0.81–0.88]	0.48

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030.t004>

appendiceal diameter. In contrast, for ruling out complicated appendicitis, the appendicitis diameter is not vital in our model. Using lab measured values only, the model reached a sensitivity of 95% at a specificity of 33% demonstrating the capability of the model to rule out complicated appendicitis in one out of three cases and thus avoiding surgery.

A few studies describe decision making within diagnostics for appendicitis with artificial neural networks (ANN) and achieve impressive results, e.g. 91% sensitivity with a specificity of 85% [22] and 100% sensitivity with a specificity of 97% [23]. However, both studies have serious weaknesses. A central concern is overfitting: Neural networks tend to overfit the data [20]. Even small neural networks are comprised of several weighting parameters. The above mentioned studies either report their performance without mentioning the size of the training and validation data or the reported training data is far too small to reliably fit all parameters of the neural network. Furthermore, they are characterized by inadequate description of predictor variables and absence of reproducibility testing of predictor variables as the variables “vomiting” and right lower quadrant (RLQ) tenderness and rebound pain exemplify demonstrate. “Vomiting” has been inadequately qualified binarily with “yes” or “no” in the studies and specification is missing in respect to quality, volume or number of episodes is missing. For RLQ, the determination of the interobserver reliability is missing which is extremely important, especially for children [10, 11].

A limitation of the present study is given by its retrospective design. We compensate this deficit by the exclusive inclusion of numeric data, which are essentially not due to personal interpretation. The appendiceal diameter is no exception here as it is the simplest sonographic parameter in suspected appendicitis with a high concordance rate between radiologists [9].

Conclusions

An interdisciplinary team of physicians, life scientists and physicists presents a model for diagnosing acute appendicitis in childhood and adolescence which has the potential to establish as a gold standard. Central quality features are given by effective methodological measures especially in order to avoid overfitting and by the use of numerical parameters, which are as far as possible not prone to personal interpretation. Due to the retrospective nature of our study we do not present a ready-to-use clinical algorithm, but our approach demonstrates significant improvements compared to today’s diagnosis and enables secure translation into clinical practice. Our approach also demonstrates significant value in ruling out complicated appendicitis with high sensitivity. Investigations on the OMICs level such as genome-wide gene expression profiling of specific cell compartments could be a path to increase the specificity.

Supporting information

S1 Fig. Relative distributions of values of features of the signature for a) the diagnosis of appendicitis and b) the differentiation in complicated and uncomplicated appendicitis. (TIF)

S2 Fig. Biomarker signatures for diagnosis of acute appendicitis (a) and complicated appendicitis (b) with and without inclusion of appendiceal diameter. (TIF)

Author Contributions

Conceptualization: Martina Schad, Marc Reismann.

Data curation: Josephine Reismann, Natalie Kiss, Maximiliane I. Minderjahn, Marc Reismann.

Formal analysis: Josephine Reismann, Alessandro Romualdi, Jim Kallarackal, Marc Reismann.

Investigation: Martina Schad.

Methodology: Alessandro Romualdi, Jim Kallarackal, Martina Schad, Marc Reismann.

Project administration: Josephine Reismann, Marc Reismann.

Software: Alessandro Romualdi, Jim Kallarackal.

Supervision: Martina Schad, Marc Reismann.

Validation: Alessandro Romualdi, Jim Kallarackal, Martina Schad.

Visualization: Alessandro Romualdi, Martina Schad.

Writing – original draft: Josephine Reismann, Marc Reismann.

Writing – review & editing: Jim Kallarackal, Martina Schad, Marc Reismann.

References

1. Addiss DG, Shaffer N, Fowler BS, Tauxe RV. The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the United States. *Am J Epidemiol.* 1990; 132: 910–925. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115734> PMID: 2239906
2. Schneider C, Kharbada A, Bachur R. Evaluating appendicitis scoring systems using a prospective pediatric cohort. *Ann Emerg Med.* 2007; 49: 778–784. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2006.12.016> PMID: 17383771
3. Huckins DS, Simon HK, Copeland K, Spiro DM, Gogain J, Wandell M. A novel biomarker panel to rule out acute appendicitis in pediatric patients with abdominal pain. *Am J Emerg Med.* 2013; 31: 1368–1375. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2013.06.016> PMID: 23891596
4. Glass CC, Rangel SJ. Overview and diagnosis of acute appendicitis in children. *Sem Ped Surg.* 2016; 25: 198–203.
5. Kwan KY, Nager AL. Diagnosing pediatric appendicitis: usefulness of laboratory markers. *Am J Emerg Med.* 2010; 28: 1009–1015. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2009.06.004> PMID: 20825931
6. Cayrol J, Miguez MC, Guerrero G, Tomatis C, Simal I, Maranon R. Diagnostic accuracy and prognostic utility of D dimer in acute appendicitis in children. *Eur J Pediatr.* 2016; 175: 313–320. <https://doi.org/10.1007/s00431-015-2632-3> PMID: 26362537
7. Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cells counts. *World J Pediatr.* 2018; 14: 504–509. <https://doi.org/10.1007/s12519-018-0173-3> PMID: 30043224
8. Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Ped Surg Int.* 2019; 35: 335–340.

9. Rawolle T, Reismann M, Minderjahn MI, Bassir C, Hauptmann K, Rothe K, et al. Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated appendicitis. *Br J Radiol*. 2019 May 29. pii: 92 (1099):20190102. <https://doi.org/10.1259/bjr.20190102> PMID: 31112397
10. Benabbas R, Hanna M, Shah J, Sinert R. Diagnostic accuracy of history, physical examination, laboratory tests, and point-of-care ultrasound for pediatric acute appendicitis in the emergency department: a systematic review and meta-analysis. *Acad Emerg Med*. 2017; 24: 523–551. <https://doi.org/10.1111/acem.13181> PMID: 28214369
11. Kulik DM, Uleryk EM, Maguire JL. Does this child have appendicitis? A systematic review of clinical prediction rules for children with acute abdominal pain. *J Clin Epidemiol*. 2013; 66: 95–104.
12. Hall NJ, Eaton S, Abbo O, Arnaud AP, Beaudin M, Brindle M, et al. Appendectomy versus non-operative treatment for acute uncomplicated appendicitis in children: study protocol for a multicentre, open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *BMJ Paediatr Open*. 2017 May 18. pii: bmjpo-2017-000028. <https://doi.org/10.1136/bmjpo-2017-000028> PMID: 29637088
13. Pham XBD, Sullins VF, Kim DY, Range Blake, Kaji AH, de Virgilio CM, et al. Factors predictive of complicated appendicitis in children. *J Surg Res*. 2016; 206: 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.07.023> PMID: 27916376
14. Romano A, Parikh P, Byers P, Namias N. Simple acute appendicitis versus non-perforated gangrenous appendicitis: is there a difference in the rate of post-operative infectious complications. *Surg Infect*. 2014; 15: 517–520.
15. Fallon SC, Kim ME, Hallmark CA, Carpenter JL, Eldin KW, Lopez ME. Correlating surgical and pathological diagnoses in pediatric appendicitis. *J Pediatr Surg*. 2015; 50: 638–641. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.11.001> PMID: 25840078
16. Coyne SM, Zhang B. Does appendiceal diameter change with age? A sonographic study. *Am J Roentgen*. 2014; 203: 1120–1126.
17. Rettenbacher T, Hollerweger A, Macheiner P, Rettenbacher L, Tomaselli F, Schneider B, et al. Outer diameter of the vermiform appendix as a sign of acute appendicitis: evaluation at US. *Radiology*. 2001; 218: 757–752. <https://doi.org/10.1148/radiology.218.3.r01fe20757> PMID: 11230651
18. Fletcher R. *Practical methods of optimization*. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2000.
19. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950; 3: 32–35. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32::aid-cnrc2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cnrc2820030106>3.0.co;2-3) PMID: 15405679
20. Park SH, Han K. Methodological guide for evaluating clinical performance and effect of artificial intelligence technology for medical diagnosis and prediction. *Radiology*. 2018 Mar; 286: 800–809. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017171920> PMID: 29309734
21. Kessler N, Cyteval C, Gallix B, Lesnik A, Blayac PM, Pujol J, et al. Appendicitis: evaluation of sensitivity, specificity, and predictive values of us, doppler us, and laboratory findings. *Radiology*. 2004; 230: 472–478. <https://doi.org/10.1148/radiol.2302021520> PMID: 14688403
22. Hsieh CH, Lu RH, Lee NH, Chiu WT, Hsu MH, Li YC. Novel solutions for an old disease: Diagnosis of acute appendicitis with random forest, support vectors machines, and artificial neural networks. *Surgery*. 2011; 149: 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.03.023> PMID: 20466403
23. Prabhudesai SG, Gould S, Rekhraj S, Tekkis PP, Glazer G, Ziprin P. Artificial neural networks: useful aid in diagnosing acute appendicitis. *World J Surg*. 2008; 32: 305–309. <https://doi.org/10.1007/s00268-007-9298-6> PMID: 18043966

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maximiliane I. Minderjahn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*Die Differenzierung von unkomplizierter und komplizierter Appendizitis im Kindesalter –
Von der Analyse der Routinediagnostik zur Überprüfung von Computer-Algorithmen*

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum, Unterschrift

Anteilerklärung an den ausgewählten Publikationen

Maximiliane I. Minderjahn hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cells counts. World J Pediatr. 2018;14: 504–509

- Konzeption der Hypothese und Entwicklung des Studiendesigns gemeinsam mit PD Dr. med. M. Reismann
- Datenerhebung
- Aufarbeitung, Auswertung und statistische Auswertung der Daten gemeinsam mit PD Dr. med. M. Reismann
- Erstellung und Überarbeitung des Manuskriptes gemeinsam mit PD Dr. med. M. Reismann

Publikation 2: Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. Ped Surg Int. 2019;35: 335–340.

- Konzeption der Hypothese und Entwicklung des Studiendesigns gemeinsam mit PD Dr. med. M. Reismann und Dr. med. D. Schädlich
- Datenerhebung gemeinsam mit Dr. med. D. Schädlich
- Aufarbeitung und Auswertung der Daten gemeinsam mit PD Dr. med. M. Reismann und Dr. med. D. Schädlich
- Überarbeitung des Manuskriptes

Publikation 3: Rawolle T, Reismann M, Minderjahn MI, Bassir C, Hauptmann K, Rothe K, et al. „Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated appendicitis.” Br J Radiol. 2019 May 29. pii: 92(1099):20190102.

- Datenerhebung gemeinsam mit Dr. med. D. Schädlich und T. Rawolle
- Überarbeitung des Manuskriptes

Publikation 4: Reismann J, Romualdi A, Kiss N, Minderjahn MI, Kallarackal J, Schad M, Reismann M. "Diagnosis and classification of pediatric acute appendicitis by artificial intelligence methods: An investigator-independent approach." PLoS One. 2019 Sep 25; 14(9):e0222030

- Datenerhebung gemeinsam mit PD Dr. med. M. Reismann, Dr. med. D. Schädlich und T. Rawolle

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Vollständige Publikationsliste

Journal-Publikationen:

- ❖ Minderjahn M, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. „Phlegmonous appendicitis is characterized by eosinophilia in white blood cells counts.“ World J Ped 2018 14(5):504–509. Epub 2018 Jul 24
- ❖ Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. „Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern.“ Pediatr Surg Int. 2019 Mar;35(3):335-340. Epub 2018 Dec 7
- ❖ Rawolle T, Reismann M, Minderjahn MI, Bassir C, Hauptmann K, Rothe K, Reismann J. „Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated pediatric appendicitis: Correlations between ultrasound findings and histological results“ Br J Radiol. 2019 Jul;92(1099):20190102. Epub 2019 May 29
- ❖ Reismann J, Romualdi A, Kiss N, Minderjahn M, Kallarackal J, Schad M, Reismann M „Diagnosis and classification of pediatric acute appendicitis by artificial intelligence methods: an investigator-independent approach.“ PLoS One. 2019 Sep 25;14(9):e0222030.

Poster:

- ❖ Marc Reismann, Maximiliane I. Minderjahn, Josephine Radtke, Karin Rothe „Der Nutzen der Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio bei der kindlichen Appendizitis ist limitiert“
- ❖ Tanja Rawolle, Marc Reismann, Maximiliane I. Minderjahn, Christian Bassir, Karin Rothe, Josephine Reismann „Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated pediatric appendicitis: Correlations between ultrasound findings and histological results“
- ❖ Marc Reismann, Dag Schädlich, Maximiliane I. Minderjahn, Josephine Radtke, Karin Rothe „Temporal and peripheral white blood cell count patterns support evidence for independent entities of appendicitis in children“

Vorträge:

- ❖ Maximiliane Minderjahn und Marc Reismann: „Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der akuten Appendizitis“ Berliner Workshop „Neue Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie der Akute Appendizitis im Kindesalter“ 23.10.2015
- ❖ J. Reismann, T. Rawolle, M. Minderjahn, N. Kiss, K. Rothe, M. Reismann: „Der Wert von Labor- und sonographischer Diagnostik bei der Differenzierung von unkomplizierter und komplizierter Appendizitis“ Kongress für Kinder- und Jugendmedizin 2019
- ❖ J. Reismann, T. Rawolle, M. Minderjahn, N. Kiss, K. Rothe, M. Reismann: „Methoden der künstlichen Intelligenz bei der akuten Appendizitis im Kindesalter: ein untersucherunabhängiger Ansatz“ Kongress für Kinder- und Jugendmedizin 2019
- ❖ M. Minderjahn, J. Weide, K. Rothe, S. Märzheuser: „Einzeitige Stoma-Rückverlagerung und transanale Durchzugsoperation nach de la Torre – Erfahrungen in einem Zentrum für kolorektale Malformationen.“ Deutscher Chirurgen Kongress 2020 (Abstract eingereicht)
- ❖ J. Weide, M. Minderjahn, K. Rothe, S. Märzheuser: „Die totale Aganglionose des Kolons. Diagnostische und therapeutische Herangehensweise.“ Deutscher Chirurgen Kongress 2020 (Abstract eingereicht)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Unterstützung diese Arbeit förderten.

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. Marc Reismann für die unermüdliche Unterstützung und Geduld über die Jahre und dafür. Ich bedanke mich für die ausgezeichnete und engagierte Betreuung und für die theoretische und praktische Unterstützung in jeder Phase der Promotion. Er war mir stets ein Vorbild wissenschaftlich zu denken und zu arbeiten und steht mir weiterhin als Mentor und Oberarzt zur Seite. Vielen Dank dafür!

Danken möchte ich ebenfalls meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Karin Rothe, die mir nicht nur erlaubte, meine Doktorarbeit in Ihrer Abteilung durchzuführen, sondern mir auch einen Platz in Ihrem Team möglich machte. Danke, dass ich jeden Tag meinem Traumberuf in der Kinderchirurgie nachgehen darf!

Weiterhin danken möchte ich Dag Schädlich für die nette Zusammenarbeit im Rahmen der zweiten Publikation.

Mein größter Dank jedoch gilt meiner Familie für die stete Motivation und Rücksichtnahme: meinen Schwestern, ich werde niemals müde dem Vorbild gerecht zu werden, das ihr in mir seht; meinen Eltern Anne-Dorette und Michael Minderjahn für Ihre Unterstützung und den steten Zuspruch; Monique und Jörg Kraffel, weil sie mir ein Zuhause waren, wenn ich nicht mehr weiter wusste und mich immer wieder aufgerichtet haben.