

Aus dem CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin

mit Perinatalzentrum und Humangenetik

Klinik für Kinderchirurgie

(Direktorin: Professorin Dr. med. Karin Rothe)

Habilitationsschrift

Die akute Appendizitis im Kindes- und Jugendalter: neue diagnostische Verfahren für die prätherapeutische Differenzierung histopathologischer Entitäten zur Unterstützung konservativer Therapiestrategien

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Kinderchirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Josephine Reismann (geb. Radtke)

Eingereicht: Mai 2022

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter*in: Prof. Dr. med. Christiane Bruns, Köln

2. Gutachter*in: Prof. Dr. med. Martin Metzelder, Wien

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	4
1.1. Epidemiologie und Pathophysiologie der akuten Appendizitis	4
1.2. Therapeutische Optionen der akuten Appendizitis	6
1.2.1. Die etablierte Therapie der akuten Appendizitis	6
1.2.2. Die konservative Behandlung der akuten Appendizitis	7
1.3. Problematik der etablierten Diagnostik bei der akuten Appendizitis	9
1.4. Innovative diagnostische Methoden	11
1.4.1. Künstliche Intelligenz	11
1.4.2. Genexpressionsanalyse	13
1.5. Zielsetzungen	15
2. EIGENE ARBEITEN IM WISSENSCHAFTLICHEN KONTEXT	16
2.1. Etablierte Diagnostik zur Differenzierung der Entitäten der Appendizitis	16
2.1.1. Labordiagnostik	16
2.1.2. Abdomensonographie	31
2.2. Anwendung und Untersuchung neuer Verfahren zur Differenzierung der Entitäten der Appendizitis	40
2.2.1. Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens auf diagnostische Routineparameter	40
2.2.2. Differenzierende genomweite Genexpressionsanalyse	52
2.2.3. Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens auf Genexpressionsdaten	60
3. DISKUSSION	68
4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	79
5. LITERATURVERZEICHNIS	81
DANKSAGUNG	95
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AUA	Akute unkomplizierte Appendizitis
ACA	Akute komplizierte Appendizitis
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. desoxyribonucleic acid
GTP	Guanosintriphosphat
IL	Interleukin
KI	Künstliche Intelligenz
ML	Maschinelles Lernen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, engl.: messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NLR	Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid
Th	T-Helferzellen

1. EINLEITUNG

1.1. Epidemiologie und Pathophysiologie der akuten Appendizitis

Die akute Appendizitis ist eine der häufigsten Indikationen für die notfallmäßige Operation im Kindes- und Jugendalter (1). Das Risiko, im Laufe des Lebens an einer akuten Appendizitis zu erkranken, beträgt 7-9%. Die akute Appendizitis kann in jedem Lebensalter auftreten, wobei ein Häufigkeitsgipfel in der Adoleszenz liegt: ca. 2/3 der betroffenen Patienten sind jünger als 30 Jahre (2).

Obwohl die akute Appendizitis ein sehr häufiges Krankheitsbild sowohl im Kindes- und Jugendalter als auch im Erwachsenenalter darstellt, ist die Ätiologie noch größtenteils unklar (3). Es werden unterschiedlichste Ursachen wie beispielsweise genetische und umweltbedingte Hintergründe sowie Infektionen mit Bakterien, Viren oder Parasiten diskutiert (4–8). Viele Autoren sehen die Obstruktion des Appendixlumens als relevanten Faktor bei der Entstehung einer akuten Appendizitis an. Demnach können u. a. Fäkolithen oder auch eine lymphatische Hyperplasie oder einer Neoplasie (Appendix- oder Coecumtumor) zur Obstruktion des Lumens mit nachfolgender Entzündung führen (8). Gegen diese Theorie spricht zum einen, dass sich eine Lumenobstruktion nur bei einem geringen Anteil der Patienten mit Appendizitis finden lässt, und zum anderen, dass Kotsteine z.B. regelmäßig bei Obduktionen gefunden werden, ohne dass eine Entzündung der Appendix vorliegt (8,9, 10,11). Eine Obstruktion kann daher zumindest nicht die alleinige Ursache in der Genese einer akuten Appendizitis darstellen.

Die Studienlage weist des Weiteren auf eine genetische Disposition für die Entwicklung einer Appendizitis hin. So haben z.B. Kinder mit akuter Appendizitis eine dreifach erhöhte Wahrscheinlichkeit, ein Familienmitglied mit stattgehabter Appendizitis zu haben, als Vergleichskinder (12). Bei einem Kind mit Appendizitis ist der Anteil der Verwandten mit stattgehabter Appendizitis vom Verwandtschaftsgrad abhängig: 21% bei Verwandten 1. Grades (Eltern, Geschwister), 12% bei Verwandten 2. Grades (Großeltern, Onkel, Tante, Nichte, Neffen) und 7% bei Verwandten 3. Grades (13).

Der grundsätzliche Nachweis einer Inflammation der Appendix erfolgt auf histopathologischer Ebene. Eine grundlegende Beschreibung der entsprechenden Veränderungen erfolgte u. a. durch Carr im Jahr 2000. Bei einer phlegmonösen Appendizitis besteht demnach eine Infiltration der Appendixwand mit neutrophilen Granulozyten ohne Hinweis auf eine wandübergreifende Nekrose. In diesem Stadium können eine ödematöse Schwellung, eine Serositis, Mikroabszesse oder Gefäßthromben vorliegen. Eine gangränöse Appendizitis ist durch Ischämie mit transmuraler Nekrose definiert. Bei der perforierenden Appendizitis kommt es auf der Basis einer gangränösen Entzündung zu einem transmuralen Defekt (9).

Geprägt vom klinischen Verlauf einer akuten Appendizitis wird auch von einer sogenannten unkomplizierten oder komplizierten Appendizitis gesprochen. Zu den kennzeichnenden klinischen Komplikationen eines komplizierten Verlaufes zählen unter anderem eine Darmatonie, Peritonitis sowie Sepsis und intraabdominelle Abszesse (14). Für viele Autoren liegt eine komplizierte Appendizitis exklusiv beim Nachweis einer Appendixperforation vor. Allerdings erscheint die Zuordnung zur komplizierten Appendizitis bereits auf der Stufe der gangränösen Appendizitis indiziert, da es (bereits) bei transmuraler Nekrose auch ohne Vorliegen eines sichtbaren Defektes zur bakteriellen Transmigration in die Bauchhöhle mit der Folge der vermehrten intraabdominellen Komplikationen wie Abszessen oder Appendixperforation kommen kann (9,15,16). Zudem ist die Mortalität im Vergleich zur phlegmonösen Appendizitis auf dieser Stufe bereits 6-mal höher (17).

Traditionell wird davon ausgegangen, dass sich eine phlegmonöse Appendizitis unweigerlich in eine gangränöse Appendizitis bis hin zur Perforation weiterentwickelt. Diese Ansicht wurde u.a. durch epidemiologische Daten in Frage gestellt. So wurde in einer retrospektiven Auswertung von 56 172 Patienten gezeigt, dass die Anzahl an phlegmonösen Appendizitiden mit der Anzahl der durchgeführten Negativappendektomien (Appendektomien ohne Nachweis einer Entzündung der Appendix = falsch positive Befunde) steigt. Die Anzahl der komplizierten Appendizitiden blieb unabhängig von der Gesamtzahl der Negativappendektomien im vergleichbaren Zeitraum konstant. Die Autoren postulierten daraufhin, dass es sich bei der nicht-perforierenden und perforierenden Appendizitis um zwei verschiedene Krankheitsbilder mit unabhängigen Dynamiken handelt (3). Auch eine weitere schwedische landesweite Kohortenstudie mit 38 939 Kindern mit Appendizitis bestätigte

epidemiologische Unterschiede zwischen unkomplizierter und komplizierter Appendizitis, wobei letztere als Appendizitis mit generalisierter Peritonitis oder Abszess definiert wurde (18).

Immunologische Studien weisen darauf hin, dass zwischen phlegmonöser und gangränöser Appendizitis grundsätzliche pathogenetische Unterschiede bestehen. Wesentlich sind hier die Studien von Marie Rubér et al. aus der Arbeitsgruppe von Roland E. Andersson aus Schweden. In einer Studie aus dem Jahr 2006 konnten sie Hinweise dafür finden, dass bei Patient*innen mit gangränöser Appendizitis eine erhöhte Sekretion von Interferon-gamma vorliegt, was auf eine Th-1- und Th-17-medierte Immunreaktion hinweist (5). So kommt es bei der gangränösen Appendizitis zur vermehrten Freisetzung von Interleukin (IL) IL-17 und IL-6 (6,19). Bei Patient*innen mit unkomplizierter Appendizitis finden sich hingegen Hinweise auf eine Aktivierung von Th2-Helferzellen (5,6). Die Nekrose der Appendix bei der gangränösen (inklusive der perforierenden) Appendizitis erscheint daher nicht nur als ein histologisches Unterscheidungskriterium im Vergleich zur phlegmonösen Appendizitis, sondern basiert wahrscheinlich auf unterschiedlichen immunologischen Pathophysiologien. Dies würde ebenfalls nahelegen, dass die gangränöse Appendizitis zur klinisch komplizierten Appendizitis zuzuordnen ist.

1.2. Therapeutische Optionen der akuten Appendizitis

1.2.1. Die etablierte Therapie der akuten Appendizitis

Bei einer akuten Appendizitis ist die Appendektomie die Therapie der Wahl (20). Charles McBurney präsentierte im Jahr 1894 sein offen chirurgisches Verfahren mit dem immer noch praktizierten Wechselschnitt (21). Mittlerweile wird aufgrund der geringeren Komplikationsrate und des kürzeren stationären Aufenthaltes die laparoskopische Appendektomie bevorzugt, welche im Jahre 1983 durch Semm erstmals beschrieben wurde (22,23).

Aufgrund der traditionellen Ansicht, dass es sich bei der Appendizitis um ein progredientes Krankheitsbild handelt, wobei unkomplizierte Formen unweigerlich in die komplizierte Appendizitis übergehen, wurde lange Zeit angenommen, dass nach Diagnosestellung

notfallmäßig operiert werden müsse, um Komplikationen zu vermeiden. Diese Annahme konnte durch mehrere Studien widerlegt werden, die zeigten, dass eine Verzögerung der Operation nicht mit einer vermehrten Rate an Komplikationen einhergeht (24–30). Daher werden auch Kinder mit akuter Appendizitis in vielen Abteilungen nicht mehr als Notfall in den Nachtstunden operiert, sondern am folgenden Tag. Die Patient*innen erhalten eine antibiotische Therapie, welche bei Diagnosestellung - aber spätestens 60 Minuten vor Operationsbeginn - begonnen werden sollte (31). Intraoperativ erfolgt ein Appendixabstrich zum Keimnachweis. Am häufigsten werden *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen (32). Gängige Empfehlungen für die antibiotische Therapie sind Cefuroxim oder Cefotaxim in Kombination mit Metronidazol oder Piperacillin/Tazobactam (32–34). Letzteres weist vorteilig und im Gegensatz zu den Cephalosporinen keine Enterokokkenlücke auf. Im Fall einer phlegmonösen Appendizitis wird die antibiotische Therapie den meisten Empfehlungen folgend in der Regel postoperativ beendet, im Fall einer gangränösen oder perforierenden Appendizitis wird eine antibiotische Therapie für weitere 3-5 Tage empfohlen (33).

Beim Vorliegen eines intraabdominellen Abszesses wird in der Regel eine primär konservative antibiotische Behandlung empfohlen. Beim Vorliegen von größeren Abszessen kann eine CT- oder sonographisch gesteuerte Einlage einer Drainage erfolgen. Diskutiert wird die anschließende Appendektomie im beschwerdefreien Intervall nach bis zu 10 Wochen (35–37).

1.2.2. Die konservative Behandlung der akuten Appendizitis

Gerade in den letzten Jahrzehnten hat die Wahrnehmung klinisch unkomplizierter Verläufe dazu geführt, dass konservative Behandlungsverfahren als Alternative zum chirurgischen Vorgehen entwickelt wurden. Die konservative Therapie weist eine große Akzeptanz bei pädiatrischen Patient*innen und deren Eltern auf und stellt zudem eine kostengünstige Alternative dar (38).

Im Jahr 2006 veröffentlichten Styruð et al. eine prospektive Studie, die 252 männliche Probanden im Alter zwischen 18 und 50 Jahren einschloss. Die Patienten wurden bei Diagnosestellung randomisiert und einer Operation oder einer antibiotischen Therapie

zugeordnet (2 Tage intravenös und anschließend 10 Tage oral). Von den rein antibiotisch behandelten Patienten benötigten 86% keine Operation; 18 Patienten wurden bei kontinuierlichen Beschwerden operiert. Die Autoren schlussfolgerten, dass die akute nicht-perforierende Appendizitis antibiotisch behandelt werden könne (39). Mittlerweile gibt es einige randomisiert-kontrollierte Studien an erwachsenen Patienten (39–41). Svensson et al. haben die Durchführbarkeit einer antibiotischen Therapie anhand von 50 pädiatrischen Patienten mit nicht-perforierender Appendizitis gezeigt, die präoperativ mittels Computertomographie diagnostiziert wurden. Bei 22 von 24 Patienten (92%), die primär antibiotisch behandelt wurden, erzielte die Therapie Symptombefreiheit (41). Ein Jahr später veröffentlichten Hartwich et al. eine weitere kontrolliert-randomisierte Studie an Kindern im Alter zwischen 5-18 Jahren, bei der ebenfalls 24 Patient*innen antibiotisch behandelt wurden (37).

Die antibiotische Therapie hat sich grundsätzlich als machbar erwiesen. Allerdings sind die Studien mit einer hohen Anzahl an Therapieversagern verbunden: Eine abschließende 5-Jahres Follow-up Studie von Patkova et al. hat eine Misserfolgsrate von 11/24 aufgrund von wiederkehrenden Anzeichen und Symptomen einer akuten Appendizitis gezeigt (42).

Es ist denkbar, dass die hohe Quote an Therapieversagern aufgrund unzureichender Auswahlkriterien entsteht: Eine komplizierte Appendizitis führte zum Studienausschluss der Patienten. Der entscheidende Punkt ist, dass die komplizierte Appendizitis allein durch die Perforation definiert wurde. Das ist zunächst verständlich: Eine Perforation ist mit einem schlechteren Outcome und einer Sterblichkeit von bis zu 5% assoziiert. Die Rate an Perforationen in der jüngeren Altersklasse erreicht Häufigkeiten von 40-57% (8,17) . Diese Definition der komplizierten Appendizitis entspricht jedoch nicht dem modernen Verständnis: Die aktuelle Studienlage spricht stark dafür, dass die komplizierte Appendizitis auf der Ebene der gangränösen Appendizitis definiert werden muss. Bereits die transmurale Nekrose bei der gangränösen Appendizitis ermöglicht die bakterielle Migration durch die Appendixwand. Diese Barrierestörung stellt aufgrund des geringeren Widerstandes der Blinddarmwand die Voraussetzung für die Perforation dar. Dies geht mit einem klinisch komplizierten Verlauf sogar ohne oder vor Auftreten einer Perforation einher (9,15,17). Somit zielen die Studiendesigns der beschriebenen randomisiert-kontrollierten Studien sehr wahrscheinlich

auf das falsche Diskriminierungsniveau. Des Weiteren haben die verwendeten diagnostischen Verfahren in den Studien zur konservativen Behandlung der Appendizitis nicht einmal ermöglicht, die Perforation zuverlässig zu erkennen (42). Die entscheidende Frage ist also, wie man die unkomplizierte von der komplizierten (gangränösen) Appendizitis bereits präoperativ unter Verzicht auf eine histologische Untersuchung unterscheiden kann, um konservative Therapiestrategien auf dieser Ebene zu unterstützen oder gar erst zu ermöglichen.

1.3. Problematik der etablierten Diagnostik bei der akuten Appendizitis

Die akute Appendizitis kann sich auf unterschiedliche Weise präsentieren. Die aktuelle Diagnosestellung basiert daher auf mehreren Pfeilern: die Anamnese, die klinische Untersuchung, die Labordiagnostik und die bildgebenden Verfahren (44). Derzeit erfolgt die Diagnostik ohne die zuverlässige Möglichkeit zur präoperativen Unterscheidung einer unkomplizierten (phlegmonösen) oder komplizierten (gangränösen) Appendizitis. In Hinblick auf die unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten wird es in Zukunft wichtig werden, die unkomplizierte und komplizierte Appendizitis - definiert auf histopathologischer Ebene - mittels diagnostischer Verfahren bereits prätherapeutisch ohne Vorliegen eines histopathologischen Befundes zu unterscheiden. Die Anamnese und die klinische Untersuchung erlauben aufgrund der vielfältigen Präsentation der Appendizitis keine Differenzierung der Appendizitidentitäten. Schon die klinische Diagnose der akuten Appendizitis an sich, ohne weitere Differenzierung, stellt insbesondere im Kindesalter eine Herausforderung dar (45).

Neben den klassischen Parametern wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und den Leukozytenzahlen bietet die Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) und neue inflammatorische Marker wie Chemokine und Enzyme eine Möglichkeit, unterschiedliche Schweregrade der akuten Appendizitis zu differenzieren (46–48). Yang et al. beschrieben 2019 ein erhöhtes CRP, höhere Leukozytenzahlen, eine Neutrophilie sowie ein erniedrigtes Serumnatrium bei Patienten mit perforierender Appendizitis (49). Die Neutrophile-to-Lymphocyte Ratio kann sowohl zur Diagnosestellung als auch zur Bestimmung des Schweregrades der akuten Appendizitis verwendet werden (50). So finden sich in der Arbeit von Kahramanca et al. ein differenzierter NLR-Grenzwert (engl. Cutoff point) für das Vorliegen

einer akuten Appendizitis von 4,68 und für die einer komplizierten Appendizitis von 5,74, definiert als gangränös oder perforierend (46). Die Arbeiten zeigen auf der einen Seite die Notwendigkeit und Anstrengungen, die Diagnostik der akuten Appendizitis laborchemisch zu verbessern. Auf der anderen Seite wird deutlich, dass keine Einigkeit hinsichtlich der Definition der Schweregrade der akuten Appendizitis besteht.

An bildgebenden Verfahren kommen die Magnetresonanztomographie (MRT), die Computertomographie (CT) sowie die Sonographie in Betracht. MRT und CT weisen eine hohe Spezifität zur Erkennung einer akuten Appendizitis auf. Hierfür ist allerdings eine Strahlenexposition und/oder das Verabreichen von Kontrastmittel notwendig (51,52). Zudem ist gerade bei kleinen Kindern aufgrund fehlender Compliance eine Sedierung erforderlich.

Die Sonographie ist als leicht durchführbare und strahlenfreie Bildgebung die zur Diagnostik der Appendizitis im Kindes- und Jugendalter bevorzugte Methode (Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Radiologie 2020). Sonographische Zeichen einer Appendizitis können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Auffälligkeiten der Appendix selbst und Umgebungsreaktionen (53). Die höchste Sensitivität und Spezifität zur Diagnostik der Appendizitis haben der Appendixdurchmesser sowie die Wandverdickung (54). Ein Appendixdurchmesser von >6 mm, eine Wandverdickung von >2 mm, freie intraabdominelle Flüssigkeit, eine umgebende Fettinflammation, ein Abszess, ein Konglomerat, ein Appendikolith und eine Lymphadenitis sind sonographische Zeichen einer Appendizitis (55–59). Allerdings erfordert die Sonographie Erfahrung und die Ergebnisse sind stark vom Untersucher-abhängig. Zudem besteht eine besondere Schwierigkeit, wenn Komplikationen wie ein perityphlitischer Abszess oder eine Perforation mit Flüssigkeitsansammlung vorliegen. Hierbei kann die Appendix ihre Struktur verlieren, sodass sie sich schlecht oder gar nicht darstellen lässt (57).

Mehrere Studien analysierten, welche Ultraschallbefunde eine Perforation der Appendizitis nahelegen. Eine retrospektive Untersuchung mit 161 Kindern konnte zeigen, dass der sonographische Nachweis eines Abszesses, der Verlust der echogenen submucosalen Schicht der Appendix und das Vorliegen eines Appendikolithen bei Kindern unter dem 8. Lebensjahr mit einer perforierenden Appendizitis assoziiert sind (56). Tulin-Silver et al. wiesen nach, dass Abszess/Flüssigkeit, ein Appendikolith, dilatierte Darmschlingen und eine erhöhte hepatische periportale Echogenität signifikant mit einer perforierenden Appendizitis bei Kindern

vergesellschaftet sind. Die Kombination von dilatierten Darmschlingen, echogenem Fett und Flüssigkeit im rechten Unterbauch wies die höchste Spezifität für das Vorliegen einer perforierenden Appendizitis auf (57). Diese beiden Studien unterscheiden allerdings nur die nicht-perforierende von den perforierenden Appendizitiden. Da die gangränöse Appendizitis aufgrund der Komplikationsrate und der potenziell entstehenden Perforation ebenfalls zu den komplizierten Appendizitiden gerechnet werden muss, ist eine sonographische Unterscheidung der phlegmonösen von den gangränösen/perforierenden Appendizitiden sinnvoll. Hierzu gibt es eine Arbeit von Xu et al. aus dem Jahr 2017. Der Verlust der submucosalen Schicht erwies sich als einziger unabhängiger Indikator einer komplizierten Appendizitis, definiert als gangränöse Appendizitis (59).

1.4. Innovative diagnostische Methoden

1.4.1. Künstliche Intelligenz

Die künstliche Intelligenz (KI) und das maschinelle Lernen (ML) stellen Untersucher-unabhängige Methoden dar, die geeignet sind, die Aussagekraft diagnostischer Methoden zu erhöhen. Es handelt sich hierbei um Teilgebiete der Computerwissenschaft. Durch künstliche Intelligenz werden einem Computer dabei autonome Fähigkeiten zur Problemlösung verliehen, ohne dass ihm jeder einzelne Schritt vorgegeben wird. Das maschinelle Lernen befasst sich mit Methoden, mit denen künstliche Intelligenz umgesetzt werden kann. Im letzten Jahrzehnt haben verbesserte Algorithmen, verbesserte Hardware und eine steigende Anzahl an verfügbaren Daten zum starken Anstieg der Anwendung von künstlicher Intelligenz in der Medizin geführt (60).

Beim maschinellen Lernen unterscheidet man hauptsächlich zwischen zwei Arten: 1) unter *supervised learning* versteht man überwachtetes Lernen basierend auf dem Training einer Datenprobe aus einer Quelle mit bereits zugewiesener korrekter Klassifizierung, 2) beim *unsupervised learning* lernen selbstorganisierende neuronale Netzwerke mithilfe eines unüberwachten Lernalgorithmus (61). Zur Entwicklung eines Modells wird der Datensatz in Daten zum Training, Daten zur Validierung und Daten für den Test des Modells geteilt. Im ersten Schritt werden die Daten zum Training durch den Anwender überwacht eingefügt. Die Daten zur Validierung werden zur Abstimmung des in Entwicklung befindlichen Algorithmus

verwendet. Die Daten für den Test des Modells dienen der ersten echten externen Validierung. Eine Situation, in der sich der Lernalgorithmus an die Trainingsdaten anpasst, wird als Overfitting bezeichnet, das es zu vermeiden gilt (62).

Beim maschinellen Lernen häufig angewendete Methoden sind *deep learning*, *support vector machines*, Ensemble-Techniken und logische Regression (63). Beim *deep learning* werden künstliche neuronale Netzwerke (*deep neural networks*) eingesetzt, wobei die Daten in einem mehrstufigen Prozess der Mustererkennung viele Zwischenschichten zwischen Eingabeschicht und Ausgabeschicht durchlaufen (64). *Support vector machines* sind Computeralgorithmen, die anhand von Beispielen lernen, Objekten bestimmte Labels zuzuordnen. Sie werden mittlerweile für eine Vielzahl von biologischen Anwendungen heran gezogen (65). Bei Ensemble-Techniken handelt es sich um Lernalgorithmen, die eine Reihe von Klassifikatoren erstellen und dann neue Datenpunkte klassifizieren, indem sie eine gewichtete Abstimmung ihrer Vorhersage durchführen (66). Bei einer logistischen Regression wird die Klassenzugehörigkeitswahrscheinlichkeit für Kategorien im Datensatz berechnet. Bei der Methode der *decision trees* teilt ein Algorithmus den Datensatz immer wieder nach einem bestimmten Kriterium, sodass die Trennung der Daten erfolgt, was zu einer baumartigen Struktur führt (67).

Im Jahr 1988 wurde das Konzept der künstlichen Intelligenz zur Diagnosefindung in der Medizin erstmals von Szolovits und Kollegen vorgestellt (68). Mittlerweile wurde die Anwendbarkeit der KI in der Diagnostik auf dem Gebiet der Chirurgie mehrfach bestätigt und es ist ein breites Anwendungsspektrum verfügbar. Im Jahr 2017 veröffentlichten Farahmand et al. eine Studie zur Anwendung von künstlicher Intelligenz bei Patienten mit akutem Abdomen in der Notaufnahme. Sie erstellten mit künstlicher Intelligenz ein Modell zur Triagierung. Allerdings schlussfolgerten sie, dass die Methode lediglich eine akzeptable Genauigkeit besitzt (69). Die Anwendbarkeit von KI wurde auch für Wundinfektionen demonstriert (70). Bertsimas et al. konnten zeigen, dass künstliche Intelligenz zur Vorhersage von Rückenmarksverletzungen im Kindesalter angewandt werden kann (71). Die Entwicklungen auf dem Gebiet der künstlichen Intelligenz lassen sich auch in anderen Bereichen auf dem Gebiet der Kinderchirurgie umsetzen und zur Optimierung der Diagnostik einsetzen (72).

1.4.2. Genexpressionsanalyse

Der Begriff Genexpression bezeichnet das Auftreten der genetischen Information (Genotyp) im Phänotyp. Der Weg vom Gen zum Genprodukt erfolgt über die Transkription und Translation. Bei der Transkription wird die doppelsträngige DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl.: desoxyribonucleic acid) mittels DNA-abhängiger RNA-Polymerasen in einsträngige mRNA (Boten-Ribonukleinsäure, engl.: messenger ribonucleic acid) umgeschrieben (73). Bei der folgenden Translation wird die mRNA durch Bindung der mRNA am Ribosom in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt und durch Faltung das funktionsfähige Protein gebildet (74). Entsprechend der Aktivität einer Zelle werden nur bestimmte DNA-Abschnitte in mRNA übersetzt, um die benötigten Proteine zu bilden. Die Analyse der kurzzeitig vorhanden mRNA entspricht somit der Aktivität der Zelle.

Über die Analyse der mRNA Synthese lassen sich spezifische Aussagen über die Art der Genexpression machen. Es ermöglicht zum einen, die Pathophysiologie der Krankheitsbilder besser zu verstehen, zum anderen können spezifische Biomarker zur Diagnostik identifiziert werden (s.u.).

Ein Krankheitsbild, zu dem einige Studien die Anwendbarkeit von Genexpression nahelegen, ist die Sepsis. Tang et al. analysierten Blutproben mittels Oligonukleotid-Mikroarray und konnten somit zeigen, dass bestimmte Gene bei Patient*innen mit Sepsis signifikant vermehrt exprimiert werden. Beim Anwenden von künstlicher Intelligenz auf die Genexpressionsdaten konnten sie eine Vorhersagegenauigkeit einer Sepsis von 88% erreichen (75). In einer pädiatrischen Studie konnten Wong et al. demonstrieren, dass eine Repression von Genen, die einer zinkbezogenen Biologie entsprechen, bei Kindern mit septischem Schock vorliegt (76). In der Arbeit von Belamuth et al. wurde Kindern mit Sepsis Blutproben zur RNA-Isolierung und Analyse mittels GeneChip Array abgenommen. Die Auswertung legt eine unterschiedliche Expression von Genen des Interferon-Signalweges und der viralen Immunität nahe. Cornell et al. diskutierten, dass Genexpressionsstudien zur kindlichen Sepsis das biologische Verständnis verbessern und hierdurch Ziele für neue Therapien identifiziert werden können (77).

Mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit der Genexpression bei Patient*innen mit akuter Appendizitis. Bereits im Jahr 2008 untersuchten Murphy et al. die inflammatorische Genexpression von 22 Kindern mit akuter Appendizitis. Ein wesentliches Ergebnis ist, dass die Höhe der Interleukin-8-Expression mit dem Grad der Neutrophileninfiltration korrelierte. Eine Subklassendifferenzierung unterschiedlicher inflammatorischer Entitäten wurde nicht durchgeführt (78).

In der Arbeit von Chawla et al. aus dem Jahr 2016 wurde eine genomweite Genexpressionsanalyse, angewendet auf Vollblut-RNA, bei Patienten mit akuter Appendizitis im Vergleich zu anderen abdominellen Erkrankungen durchgeführt. Auch hier wurde die Appendizitis als homogenes Krankheitsbild betrachtet und keine unterschiedlichen Appendizitisentitäten untersucht. Es konnten 37 unterschiedlich exprimierte Gene nachgewiesen werden, die in 3 Gruppen eingeteilt wurden: infektionsbedingt, entzündungsbedingt und ribosomale Verarbeitung. Die Veränderungen des mRNA-Expressionsspiegels bei Patient*innen mit akuter Appendizitis hingen mit dem angeborenen Abwehrsystem von Neutrophilen zusammen (79).

Biomarkersignaturen auf Genexpressionsbasis haben das Potential, ein zentrales Werkzeug zur Diagnostik von infektiösen Erkrankungen zu werden. Sie sind definiert als möglichst kleine Kombinationen von nicht-redundanten Genen mit der bestmöglichen Vorhersagekraft und der maximalen Reproduzierbarkeit. Eine Voraussetzung zur klinischen Anwendung ist eine schnelle und kostengünstige Detektierung der Genexpression (80).

1.5. Zielsetzungen

Bezüglich der beschriebenen Zusammenhänge ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Welche Aussagekraft hat die etablierte apparative Diagnostik und Labordiagnostik hinsichtlich der präoperativen Unterscheidung von histologisch phlegmonöser und gangränöser Appendizitis?
 - a. Lassen sich die Entitäten anhand von Merkmalen im Differenzialblutbild und beim CRP unterscheiden?
 - b. Lassen sich die Entitäten anhand sonographischer Kriterien unterscheiden?
- 2) Kann die diagnostische Sicherheit bei der Unterscheidung der Appendizitisentitäten durch die Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz auf routinediagnostische Parameter erhöht werden?
- 3) Lassen sich durch eine genomweite Genexpressionsanalyse Rückschlüsse auf unterschiedliche pathophysiologische Vorgänge bei den Entitäten ziehen? Gibt es Hinweise auf diagnostisch anwendbare molekulare Marker?
- 4) Ergeben sich durch die Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz auf Genexpressionsdaten differenzierende Biomarkersignaturen zur Unterscheidung der Appendizitisentitäten (Proof-of-Concept)?

2. EIGENE ARBEITEN IM WISSENSCHAFTLICHEN KONTEXT

2.1. Etablierte Diagnostik zur Differenzierung der Entitäten der

Appendizitis

2.1.1. Labordiagnostik

P1 Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr.* 2018;14(5):504-509. Doi: <http://doi.org/10.1007/s12519-018-0173-3>

Die aktuelle Datenlage hat gezeigt, dass bei Patient*innen mit unkomplizierter, phlegmonöser Appendizitis eine konservative Therapie grundsätzlich durchführbar ist. Für Patient*innen mit komplizierter Appendizitis bleibt die operative Therapie die Methode der Wahl (38–43). Die Frage, wie die unkomplizierte phlegmonöse Appendizitis präoperativ von der komplizierten gangränösen Form unterschieden werden kann, ist noch ungeklärt.

Studien weisen darauf hin, dass bei den unterschiedlichen Entitäten der akuten Appendizitis verschiedene immunologische Mechanismen eine Rolle spielen (5,6). Die leukozytären Kompartimente lassen als „Endprodukte“ pathophysiologischer Vorgänge Rückschlüsse auf diese Prozesse zu. Der CRP-Wert wiederum lässt Rückschlüsse auf die Intensität der Entzündungsreaktion zu. Daher wurden in den vorliegenden Arbeiten die Differenzialblutbilder und die CRP-Werte von Patient*innen mit Appendizitis analysiert.

In einer ersten Studie wurden 647 Kinder eingeschlossen und die Subpopulationen der Leukozyten und die CRP-Werte zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme analysiert.

Als allgemeiner inflammatorischer Parameter stieg das CRP bei Patient*innen mit gangränöser komplizierter Appendizitis (ACA) kontinuierlich an, wohingegen das CRP bei Patient*innen mit phlegmonöser unkomplizierter Appendizitis (AUA) im Mittel niedrigere Werte und einen Abfall nach über 36h nach Symptombeginn zeigte. Bei der Auswertung des Blutbildes konnte nachgewiesen werden, dass die Leukozyten bei Patient*innen mit ACA signifikant höher waren als bei Patient*innen mit AUA. Bei beiden Patientengruppen fiel der

Wert der Leukozyten mit der Dauer nach Symptombeginn ab. Kinder mit ACA zeigten im Mittel signifikant erhöhte Werte der neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Zentral war die Beobachtung, dass die Inflammation von Kindern mit AUA durch eine statistisch signifikante relative Erhöhung von eosinophilen und basophilen Granulozyten gekennzeichnet war. Dies war insbesondere mit Evidenz zur Th2-Abhängigkeit der phlegmonösen Appendizitis vereinbar.

Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr.* 2018;14(5):504–9. Doi: 10.1007/s12519-018-0173-3

Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr.* 2018;14(5):504–9. Doi: 10.1007/s12519-018-0173-3

Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr.* 2018;14(5):504–9. Doi: 10.1007/s12519-018-0173-3

Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr.* 2018;14(5):504–9. Doi: 10.1007/s12519-018-0173-3

Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr.* 2018;14(5):504–9. Doi: 10.1007/s12519-018-0173-3

Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr.* 2018;14(5):504–9. Doi: 10.1007/s12519-018-0173-3

P2 Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int.* 2019;35(3):335-340. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00383-018-4423-1>

In einer zweiten Arbeit wurden die mittleren Zellzahlen der Leukozyten und CRP-Werte bei 858 Patient*innen mit akuter Appendizitis in Relation zum zeitlichen Verlauf von Beginn der abdominalen Schmerzsymptomatik bis zur Blutentnahme untersucht. Zur Datenauswertung wurden daher 12-Stunden Intervalle nach Symptombeginn definiert: 0-12h, >12-24 h, >24-36h, >36-48h, >48-72 und >72 h nach Symptombeginn.

Der Verlauf des CRP war bei Patient*innen mit ACA von einem deutlichen Anstieg über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung geprägt. Im Gegensatz hierzu lag der initiale CRP Wert bei Patient*innen mit AUC bereits im ersten Zeitintervall signifikant niedriger und stieg auch über den Verlauf der Erkrankung deutlich weniger an. Interessanterweise zeigte sich kein signifikanter Unterschied des CRP beim Vergleich von Kindern mit AUC und Kindern mit Negativappendektomie.

Die Leukozyten waren bei Patient*innen mit ACA in jedem Zeitintervall signifikant höher als bei Kindern mit AUA. Bei Kindern mit AUA fand sich eine signifikante Erhöhung der eosinophilen Granulozyten im Vergleich zu ACA, welche über die Zeitintervalle stabil nachweisbar war. Bei Patient*innen mit ACA war die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und Monozyten erhöht.

Somit konnten die Unterschiede, die bereits in der vorherigen Arbeit gezeigt wurde, auch zeitlich stabil nachgewiesen werden. Dies kann als weiterer Hinweis auf die unterschiedlichen Entitäten gewertet werden, da ein Übergang der einen in die andere Entzündungsform auf der Basis dieser Daten unwahrscheinlich erscheint.

Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int.* 2018;35(3):335-40. Doi: 10.1007/s00383-018-4423-1

Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int.* 2018;35(3):335-40. Doi: 10.1007/s00383-018-4423-1

Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int.* 2018;35(3):335-40. Doi: 10.1007/s00383-018-4423-1

Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int.* 2018;35(3):335-40. Doi: 10.1007/s00383-018-4423-1

Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int.* 2018;35(3):335-40. Doi: 10.1007/s00383-018-4423-1

Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int.* 2018;35(3):335-40. Doi: 10.1007/s00383-018-4423-1

2.1.2. Abdomensonographie

P3 Rawolle T, Reismann M, Minderjahn MI, Bassir C, Hauptmann K, Rothe K, Reismann J. Sonographic differentiatino of complicated from uncomplicated appendicitis. *Br J Radiol*. 2019;92(1099):20190102. Doi: 10.1259/bjr.20190102

Neben der klinischen Untersuchung und der Blutbilduntersuchung ist die Bildgebung mittels Sonographie eine etablierte Diagnostik der akuten Appendizitis (81). In Zukunft wird nicht nur die Frage geklärt werden müssen, ob es sich bei den Patient*innen um eine akute Appendizitis handelt, sondern auch, ob es sich um eine unkomplizierte (histopathologisch phlegmonös) oder komplizierte Appendizitis (histopathologisch gangränös oder perforierend) handelt, um dadurch unterschiedliche Therapien (konservativ vs. operativ) einleiten zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv die sonographischen Befunde von 446 Kindern mit unkomplizierter Appendizitis und von 348 Kindern mit komplizierter Appendizitis analysiert. Die besondere Herausforderung bei dieser Arbeit bestand erneut darin, dass das relevante Kriterium zur Unterscheidung nicht wie in anderen Arbeiten durch die Perforation, sondern durch die transmurale Nekrose gekennzeichnet war.

Es konnte nachgewiesen werden, dass einige in der Abdomensonographie erfassten Befunde zur Unterscheidung zwischen einer so definierten unkomplizierten und komplizierten Appendizitis dienen können. Geeignete Parameter sind der Appendixdurchmesser, die periappendizitische Fettinflammation und das Vorhandensein eines Appendikolithen sowie die durch den Kinderradiologen vermutete Perforation. Die Assoziation dieser Befunde mit der komplizierten Appendizitis war im Rahmen der univariaten und multivariaten logistischen Regressionsanalysen durch entsprechende Odds Ratios und statistische signifikante Unterschiede gekennzeichnet.

Cite this article as: 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; **92**: 20190102.

FULL PAPER

Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated appendicitis

¹TANJA RAWOLLE, ¹MARC REISMANN, MD, PhD, ¹MAXIMILIANE I MINDERJAHN, ²CHRISTIAN BASSIR, MD, ³KATHRIN HAUPTMANN, ¹KARIN ROTHE, MD, PhD and ¹JOSEPHINE REISMANN, MD

¹Department of Pediatric Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz, Berlin, Germany

²Department of Pediatric Radiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz, Berlin, Germany

³Department of Pathology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz, Berlin, Germany

Address correspondence to: Dr Josephine Reismann
E-mail: j.reismann@gmx.de; Josephine.reismann@charite.de

Objective: This study aims to differentiate acute uncomplicated and complicated appendicitis, by investigating the correlation between sonographic findings and histological results in different types of paediatric appendicitis.

Methods: This is a retrospective study of 1017 paediatric patients (age < 18 years) who underwent ultrasound by paediatric radiologists before appendicectomy at our institution between 2006 and 2016. Histologically, uncomplicated appendicitis was primarily associated with transmural infiltration of neutrophil granulocytes, while complicated appendicitis was characterised by transmural myonecrosis. Logistic regression analyses were used to investigate the association between sonographic and histological findings.

Results: Out of 566 (56%) male and 451 (44%) female patients with a mean age of 10.7 years, uncomplicated appendicitis was histologically diagnosed in 446 (44%) children and complicated appendicitis was diagnosed in 348 (34%) cases. The following ultrasound findings were significantly associated with complicated appendicitis in multivariate regression: an increased appendiceal diameter (OR = 1.3, $p < .001$), periappendiceal fat inflammation (OR = 1.5, $p = 0.02$), the presence of an

appendicolith (OR = 1.7, $p = 0.01$) and a suspected perforation (OR = 6.0, $p < .001$) by the pediatric radiologist. For complicated appendicitis, an appendiceal diameter of more than 6 mm had the highest sensitivity (98%), while a sonographically suspected perforation showed the highest specificity (94%).

Conclusion: Abdominal sonography by paediatric radiologists can differentiate between uncomplicated and complicated appendicitis in paediatric patients by using an increased appendiceal diameter, periappendiceal fat inflammation, the presence of an appendicolith and a suspected perforation as discriminatory markers.

Advances in knowledge: This paper demonstrates expanded information on ultrasound, which is not only an essential tool for diagnosing appendicitis, but also a key method for distinguishing between different forms of appendicitis when performed by paediatric radiologists. Compared with previous studies, the crucial distinction features in our analysis are 1) the definition of gangrene and not primarily perforation as an acute complicated appendicitis enabling early decision-making by sonography and 2) a large number of patients in a particularly affected age group.

INTRODUCTION

The distinction between different forms of acute appendicitis (AA)^a through the use of abdominal ultrasound by (paediatric) radiologists will become more important in the near future due to the fact that epidemiological and immunological studies strongly support the view that histologically phlegmonous appendicitis (corresponding to clinical acute uncomplicated appendicitis; AUA^b) and histologically gangrenous appendicitis possibly leading to perforation (corresponding to clinical acute complicated appendicitis; ACA^c) seem to be independent entities.¹⁻⁵

The differentiation is relevant for various reasons. Early detection of complicated appendicitis including gangrene with or without perforation is crucial for timely application of special antibiotic regimens and for estimation of the optimal time point for surgery.⁶ Furthermore, this kind of differentiation might even offer the possibility of different treatment options. Nowadays, acute appendicitis is the most common diagnosis of paediatric patients who undergo surgical treatment and patients still experience a remarkably high rate of postoperative complications, despite the fact that most of the procedures are performed

laparoscopically.⁷⁻⁹ However, recent and upcoming paediatric studies have confirmed or the aim to support that nonoperative management with antibiotics is a feasible and safe option for patients with acute uncomplicated phlegmonous appendicitis while appendectomy remains the appropriate treatment for acute complicated appendicitis defined by gangrene or perforation.¹⁰⁻¹⁵ Of note, conservative treatment leads to symptom relief just after one day and thus is not inferior to appendectomy concerning this matter.¹⁶ Therefore, the use of ultrasound for the pre-operative differentiation between gangrenous/perforated appendicitis and uncomplicated appendicitis is important, especially in regard of defining treatment groups.

Different studies tried to preoperatively distinguish AUA and ACA by means of imaging methods as MRI or CT. Even if these methods achieved high specificity values between 85 and 99% for detecting perforated appendicitis, they were associated with either radiation exposure or injection of a contrast medium.^{17,18} However, ultrasound is considered to be the most appropriate imaging method to diagnose paediatric AA with a specificity greater than 98%.¹⁹ Moreover, ultrasound was recently shown to be a reliable imaging method to differentiate between perforated and non-perforated appendicitis by means of highly specific findings like the loss of the echogenic submucosal layer and complex periappendiceal fluid.²⁰⁻²² Blumfield et al presented a score combining laboratory values, clinical presentations and ultrasound findings that yielded specificity for ACA of up to 99%.²³ However, these authors concentrated on the differentiation of perforated and non-perforated appendicitis, while current evidence suggests that complicated appendicitis is already given earlier in the pathophysiological process by the presence of transmural myonecrosis.⁶ The present study aims to investigate ultrasound as a discriminatory tool to differentiate between acute uncomplicated appendicitis and acute complicated appendicitis. The outstanding importance of this paper is demonstrated by the extended number of exclusively paediatric and adolescent patients.

^a acute appendicitis

^b acute uncomplicated appendicitis

^c acute complicated appendicitis

METHODS

This is a single-center retrospective study of all patients aged 0–17 years who underwent ultrasound for suspected acute appendicitis at the department of paediatric surgery of Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany between December 2006 and September 2016. Our institutional review board and the ethical committee approved this study.

Study population

Eligible participants were identified by searching our hospital information system for all paediatric patients who underwent appendectomy. Medical charts of all patients who received ultrasound examinations before appendectomy were reviewed for gender, age, date of admission, date of operation, histopathology

and ultrasound findings. Exclusion criteria consisted of missing histopathology, missing data, secondary or elective appendectomy, oxyuriasis and carcinoid (Figure 1).

Ultrasound examination

All ultrasound examinations were performed or directly supervised by experienced consultant paediatric radiologists, who were all members of the board, in case of suspected appendicitis. Radiologists had access to the medical charts and anamnesis of patients. The abdominal sonography was performed with a convex or linear transducer (1 and 12 MHz) adapted to the patient's body constitution. The radiologists' reports were analysed for ultrasonographic features standardly examined and according to previous studies, including the following: the appendiceal wall diameter, periappendiceal fat inflammation, free abdominal fluid, abscess, conglomerate, appendicolith and lymphadenitis.²⁰⁻²⁴ Therefore, the appendiceal diameter was measured from outer wall to outer wall. Appendiceal wall oedema was defined as an obliteration of the layers. Periappendiceal fat inflammation was diagnosed when an increased echogenicity of the periappendiceal tissue was observed. Free abdominal fluid was defined as both simple and complex localised fluid, whether in direct proximity of the appendix or not, whereas an abscess was diagnosed when a walled-off accumulation of periappendiceal fluid was identified. Conglomerate was defined as an appendix grouped together with or indistinguishable from other intestinal structures. An appendicolith was diagnosed when an intraluminal hyperechogenic focus with an acoustic shadow was identified. Lymphadenitis was defined as sonographically detectable lymph nodes. In some cases the radiologist documented a suspected perforation due to the overall composition of pathological changes. During the review process, vague ultrasound reports were discussed with the most experienced radiologist to classify the ultrasound findings according to our categories.

Histopathological classification

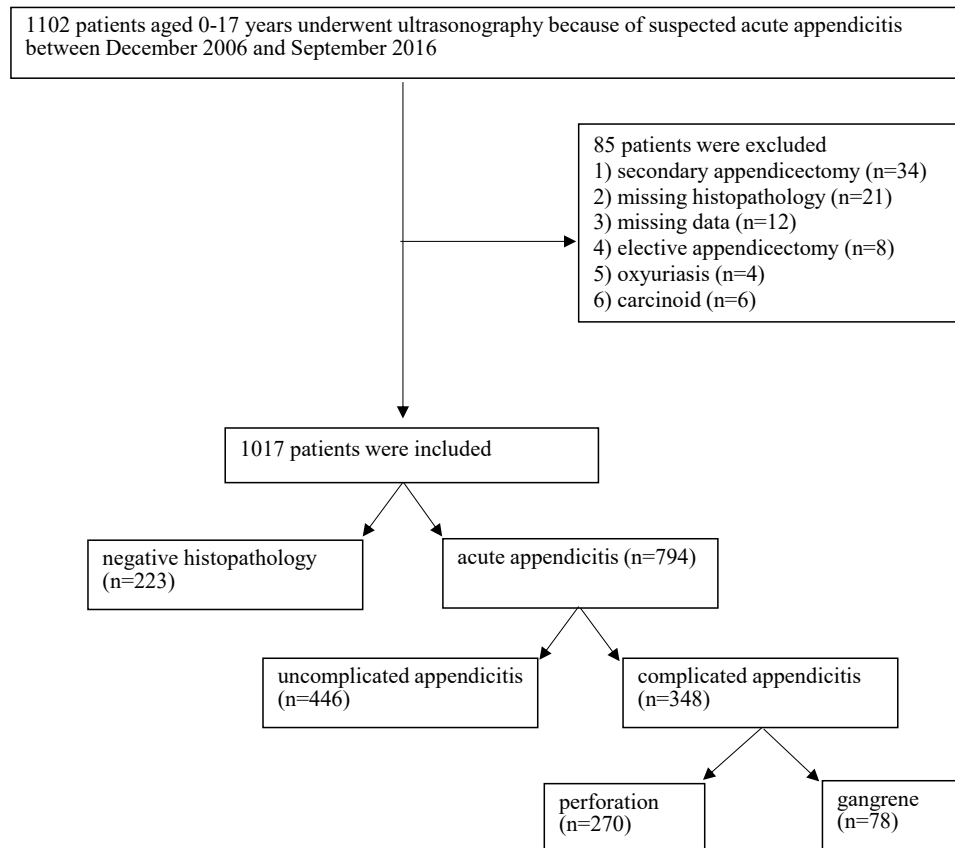
Histopathological analyses were retrospectively reviewed to classify appendicitis. The following three groups of appendicitis were differentiated: phlegmonous, gangrenous and perforated appendicitis. Phlegmonous appendicitis was defined by transmural neutrophilic infiltration of the appendix without gangrene or perforation. Gangrenous appendicitis was characterised by ischemic areas with transmural myonecrosis, while perforation was defined by the presence of a transmural defect.²⁵ In clinical settings the histological finding of phlegmonous appendicitis directly corresponds with uncomplicated courses (AUA), whereas gangrenous appendicitis and perforation are categorised as acute complicated appendicitis (ACA), as stated in the literature.^{6,25}

Correlations between ultrasound findings and histopathological results are visualised in Figure 2.

Statistical analysis

Categorical variables are reported as frequencies and percentages, whereas continuous variables are given as mean \pm standard deviation (SD) values. Age is given as mean and range. Univariate logistic regression analysis was performed on each

Figure 1. Patient flow diagram.



sonographic finding regarding the histopathological diagnosis of acute complicated appendicitis. To determine a proper model for the multivariate regression analysis a backward variable elimination algorithm was performed based on the $-2 \cdot \text{Log-Likelihood}$ criterion where variables with $p \geq 0.1$ were eliminated. For this reason, only the following five variables were included in the multivariate regression: the appendiceal wall diameter, periappendiceal fat inflammation, conglomerate, the presence of an appendicolith and a suspected perforation. Results are presented as Odds Ratios (OR) with a confidence interval of 95%. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value for each sonographic finding were calculated. Data was statistically analysed with SPSS (IBM) version 25. Significant differences were defined by a corrected error probability of $p \leq 0.05$.

Since the study is retrospective and observational, we did not perform a sample size calculation (power analysis) before the commencement of the study. However, with a sample size of $n =$

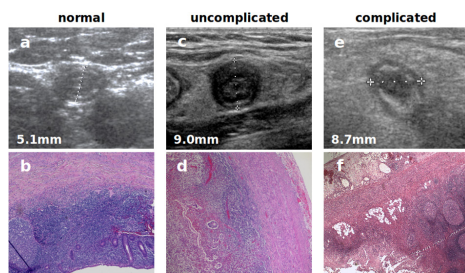
794 patients ($n = 446$ with AUA; $n = 348$ with ACA) the study has sufficient statistical power to detect small effect sizes. Assuming that for a binary variable X the probability $P(\text{complicated} | X = 0) = 0.438$ (relative frequency of cases with complicated appendicitis) the Wald test (logistic regression) has a power of more than 80% to detect an odds ratio $OR = \frac{P(\text{complicated} | X = 1)}{P(\text{not complicated} | X = 1)} / \frac{P(\text{complicated} | X = 0)}{P(\text{not complicated} | X = 0)}$ of $OR = 1.492$. The test is two-sided and the level of significance is $\alpha = 0.05$. The power analysis was carried out using the software PASS 16.

RESULTS

Patient sample

1017 out of 1102 patients who received ultrasound due to suspected acute appendicitis (AA) and who underwent appendicectomy, met the inclusion criteria (566 (56%) male and 451 (44%) female patients). Patients were excluded from further

Figure 2. Negative: a: normal sonography of appendix; b: normal histopathological conditions with normal wall structure and no signs of inflammation. Phlegmonous (= acute uncomplicated appendicitis): c: appendix with marked echogenic reaction; d: diffuse granulocytic infiltration of the wall into the subserous fatty tissue and the mesenterium. Gangrenous (= acute complicated appendicitis): e: wall oedema, beginning fragmentation of the wall structure; f: microabscesses in the wall and circumscribed almost complete wall necrosis. Severe fibrinous-purulent serositis. Fibrinous-purulent inflammation of adjacent fatty tissue.



analysis due to secondary appendicectomies ($n = 34$), missing histopathology ($n = 21$), missing data ($n = 12$), elective appendicectomy ($n = 8$), oxyuriasis ($n = 4$) and carcinoids ($n = 6$) (Figure 1). Histopathologically 794 (78%) cases provided a diagnosis of acute appendicitis including 446 (56%) patients with AUA and 348 (44%) children with ACA. The negative appendicectomy rate was 22% ($n = 223$).

The patients mean age was 10.7 (0–17) years. In comparison, patients suffering from AA (AUA and ACA) were significantly younger than patients, who turned out to be negative (10.2 (0–17) vs 12.3 (1–17), $p < .001$). It was more common for male patients to be diagnosed with histopathological proven AA than female patients ($n = 477$, 60% vs $n = 317$, 40%, $p <$

0.001), while gender composition in patients with negative histology was reversed (male: $n = 88$, 39% vs female: $n = 135$, 61%, $p < 0.001$). The appendix was sonographically detectable in 862 (85%) patients, whereby radiologists were significantly less successful in locating the appendix in patients with negative histology as with AA ($n = 54$, 24% vs $n = 101$, 13%; $p < .001$). There were also significant differences between both groups (AA vs negative histology) regarding mean appendiceal diameter values (9.8 ± 2.5 mm vs 7.2 ± 1.6 mm, $p < .001$). The sonographers expected a phlegmon in 180 (18%) patients, which was 48% consistent with the histopathological diagnosis. In 145 (14%) cases, radiologists suspected a perforation matching 67% ($n = 97$) with the histopathological result. In 692 (68%) sonographic reports the radiologists did not differentiate between AUA and ACA (Table 1).

Acute complicated appendicitis

Patients with ACA ($n = 348$) included 270 (78%) cases with histopathologically diagnosed perforation and 78 (22%) cases in which a gangrenous appendix was identified. Mean age of ACA was 9.4 years (0–17) and was thus significantly younger than the mean age of patients with AUA (10.9 (1–17), $p < .001$). The gender composition was comparable in both groups (ACA vs AUA). The mean appendiceal diameter of patients with ACA was significantly increased compared to that of patients with AUA (10.5 ± 2.6 mm vs 9.3 ± 2.2 mm, $p < .001$) (Table 1).

To identify associations between sonographic findings and ACA, univariate and multivariate logistic regression analyses were performed. In univariate logistic regression, the following sonographic findings were significantly associated with ACA: an increased appendiceal diameter (OR = 1.3, $p < .001$), periappendiceal fat inflammation (OR = 2.3, $p < .001$), free abdominal fluid (OR = 1.4, $p = 0.02$), abscess (OR = 14.0, $p < .001$), conglomerate (OR = 17.7, $p < .001$), appendicolith (OR = 2.3, $p < .001$) and the suspicion of a perforation expressed by the radiologist (OR = 8.8, $p < .001$) (Table 2).

Table 1. Distribution of age, sex and sonographic findings

Characteristic	Total ($n = 1017$)	AA ($n = 794$)	AUA ($n = 446$)	ACA ($n = 348$)	Negative ($n = 223$)
Age (years)	10.7 (0–17)	10.2 (0–17)	10.9 (1–17)	9.4 (0–17)	12.3 (1–17)
Sex					
Male	566 (56%)	478 (60%)	263 (59%)	215 (62%)	88 (40%)
Female	451 (44%)	316 (40%)	183 (41%)	133 (38%)	135 (60%)
Appendiceal wall diameter (mm)	9.3 ± 2.5	9.8 ± 2.5	9.3 ± 2.2	10.5 ± 2.6	7.2 ± 1.6
Appendiceal wall oedema	74 (7%)	68 (9%)	42 (9%)	26 (7%)	6 (3%)
Periappendiceal fat inflammation	452 (44%)	426 (54%)	225 (51%)	201 (58%)	26 (12%)
Free abdominal fluid	419 (41%)	348 (44%)	187 (42%)	161 (46%)	71 (32%)
Abscess	16 (2%)	16 (2%)	2 (<1%)	14 (4%)	0
Conglomerate	10 (1%)	10 (1%)	1 (<1%)	9 (3%)	0
Appendicolith	135 (13%)	124 (16%)	54 (12%)	70 (20%)	11 (5%)
Lymphadenitis	165 (16%)	132 (17%)	79 (18%)	53 (15%)	33 (15%)

AA: acute appendicitis, AUA: acute uncomplicated appendicitis, ACA: acute complicated appendicitis.

Table 2. Sonographic findings and associations with acute complicated appendicitis ($n = 348$) in 1017 patients with suspected acute appendicitis

Sonographic finding	Univariate Logistic Regression		Multivariate Logistic Regression ^a	
	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)
Appendiceal wall diameter a	<.001	1.34 (1.26–1.43)	<.001	1.27 (1.18–1.36)
Appendiceal wall oedema	0.86	1.05 (0.64–1.71)		
Periappendiceal fat inflammation	<.001	2.28 (1.75–2.97)	0.02	1.51 (1.08–2.11)
Free abdominal fluid	0.02	1.37 (1.06–1.78)		
Abscess	<.001	13.98 (3.16–61.86)		
Conglomerate	<.001	17.74 (2.24–140.56)	0.11	6.66 (0.66–67.51)
Appendicolith	<.001	2.34 (1.62–3.38)	0.01	1.73 (1.12–2.67)
Lymphadenitis	0.54	0.89 (0.63–1.28)		
Expected perforation	<.001	8.75 (5.79–13.21)	<.001	6.03 (3.78–9.62)

P values are specified to two significant digits unless <.001. OR: odds ratio.

^a $n = 862$ patients with sonographically detectable appendixes.

In multivariate analysis, statistically significant positive associations with ACA were only found for an increased appendiceal diameter (OR = 1.3, $p < .001$), periappendiceal fat inflammation (OR = 1.5, $p = 0.02$), the presence of an appendicolith (OR = 1.7, $p = 0.01$) and a suspected perforation by the paediatric radiologist (OR = 6.0, $p < .001$) among the sonographic findings examined (Table 2).

The highest sensitivity (98%) of all investigated parameters that were significantly associated with ACA had an appendiceal diameter of more than 6 mm, whereas specificity (11%) is very low for this characteristic. Higher specificity values are observed with increasing appendiceal diameters (>6 mm) at the expense of sensitivity values. The most specific (94%) sonographic finding

of ACA is an expected perforation by the paediatric radiologist (Table 3). The concordance rate of a suspected perforation by the paediatric radiologist and histopathology was 67% ($n = 97$). However, the remaining 33% ($n = 48$) had the following histopathological results: 20% ($n = 29$) phlegmonous appendicitis, 10% ($n = 14$) gangrenous appendicitis and 3% ($n = 5$) negative histopathology.

DISCUSSION

The differentiation between AUA and ACA aroused new interest due to recent studies indicating that an antibiotic-only treatment for children with AUA is safe.^{10,13} Therefore, imaging modalities seem to be a suitable method to accomplish a reliable distinction between AUA and ACA. Moreover,

Table 3. Sensitivity and specificity values of sonographic findings for acute complicated appendicitis

Sonographic finding	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Appendiceal wall diameter				
>5 mm	99.4 (97.4,99.9)	2.1 (1.2,3.5)	34.6 (34.3,34.9)	87.5 (61.5,96.8)
>6 mm	98.0 (95.9,99.2)	11.4 (9.1,14.0)	36.5 (25.8,37.2)	91.6 (83.5,95.9)
>7 mm	94.5 (91.6,96.7)	25.7 (22.4,29.2)	39.8 (38.6,41.1)	90.1 (85.2,93.5)
>8 mm	81.9 (77.4,85.8)	43.9 (40.1,47.8)	43.2 (41.2,45.2)	82.4 (78.6,85.6)
>9 mm	68.1 (62.9,73.0)	58.1 (54.3,61.9)	45.8 (43.0,48.7)	77.8 (74.8,80.5)
Appendiceal wall oedema	7.5 (4.9,10.8)	92.8 (90.6,94.7)	35.1 (25.5,46.2)	65.9 (65.0,66.7)
Periappendiceal fat inflammation	57.8 (52.4,63.0)	62.5 (58.5,66.1)	44.5 (41.2,47.8)	74.0 (71.3,76.5)
Free abdominal fluid	46.3 (40.9,51.7)	61.4 (57.6,65.1)	38.4 (35.0,42.0)	68.7 (66.2,71.1)
Abscess	4.0 (2.2,6.7)	99.7 (98.9,100)	87.5 (61.5,96.8)	66.6 (66.1,67.1)
Conglomerate	2.6 (1.2,4.9)	99.9 (99.2,100)	90.0 (53.4,98.6)	66.3 (66.0,66.7)
Appendicolith	20.1 (16.0,24.7)	90.3 (87.8,92.4)	51.9 (44.1,59.5)	68.5 (67.2,69.7)
Lymphadenitis	15.2 (11.6,19.4)	83.3 (80.2,86.0)	32.1 (26.0,39.0)	65.3 (64.1,66.6)
Expected perforation	31.9 (27.0,37.1)	94.9 (93.9,96.5)	76.6 (69.5,82.4)	72.8 (71.3,74.3)

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Data in parentheses are the 95% confidence interval.

ultrasound as a radiation-free tool is the imaging method of choice for evaluating paediatric patients with suspected AA and was even shown to be useful to improve diagnostic accuracy of advanced imaging methods like CT.²⁶ Accordingly, this study has a focus on the ultrasonographic findings in different forms of appendicitis in a great cohort of paediatric patients. Advantageously, this study only took into account ultrasound reports performed by highly trained paediatric radiologists to support the diagnostic process. Whereas most hospitals rely on ultrasound by emergency physicians with different levels of experience, which could lead to inconclusive results as well as limited sensitivity and specificity.²⁷ Thus, we hoped to identify sonographic findings that could broaden the approach and aid differentiation between uncomplicated and complicated appendicitis, including gangrenous and perforated appendicitis.

Firstly, we were able to confirm that in multivariate analysis, an increased appendiceal diameter and the presence of an appendicolith are significantly associated with acute complicated appendicitis. Furthermore, in comparison to studies with much smaller patient numbers, we were able to add the fact that periappendiceal fat inflammation was significantly associated with an acute complicated appendicitis.^{20,21} On top of that, we could gain evidence that the preoperatively suspected histological categorisation (perforation) of appendicitis determined by a paediatric radiologist using ultrasound is a highly specific diagnostic component.

Moreover, our study confirmed that an appendiceal diameter greater than 6 mm achieved the highest sensitivity for ACA (98%). On the other hand, specificity was quite insufficient (11%). In addition, appendiceal diameter values of patients with negative appendectomy ranged from 2 to 13 mm, which indicates that relying on an appendiceal diameter greater than 6 mm could lead to appendectomy not only in patients with uncomplicated appendicitis, but also in children without appendicitis. Moreover, Park et al observed that faecal impaction of the appendix leads to misdiagnosis of acute appendicitis by increasing the appendiceal diameter without any inflammation as well.²⁸ This points out that a critical value of the appendiceal diameter for appendicitis is not feasible, although a 6 mm diameter is frequently defined as the diagnostic cutoff for appendicitis.¹⁹ However, specificity can be improved by increasing appendiceal diameter values to the detriment of sensitivity values.

Most interestingly, in this study periappendiceal fat inflammation was significantly associated with ACA, whereas previous studies could only suggest a positive association with perforation without significance.^{20,21} This might be primarily attributable to the substantially greater study population investigated in this research. Besides, the inclusion of gangrenous appendicitis as complicated appendicitis versus only perforation could have an effect. This would be compatible with the results of Xu et al, who suggested associations between periappendiceal fat inflammation and ACA including gangrene - but without statistical significance in a small study group.²⁴

The presence of an appendicolith was a highly specific (90%) sonographic finding for ACA. The importance of detecting appendicoliths as a sign of ACA was also promoted by Mahida et al who reported a failure rate of 60% for conservative treatment of children with an appendicolith.²⁹ Moreover, Gonzalez et al already suggested that ultrasound is a reliable test to identify complicated appendicitis and patients with appendicoliths (sensitivity: 58%; specificity: 78%) to exclude them from nonoperative treatment.³⁰ Interestingly, our study's data showed that children with appendicoliths were significantly younger than those without appendicoliths (9.6 (1-17) vs 10.8 (0-17) years, $p < .001$), which was consistent with age groups comparing ACA and AUA (9.4 (0-17) vs 10.9 (1-17) years, $p < .001$). This fact validated the presence of an appendicolith to be a key criterion for differentiating complicated from uncomplicated appendicitis.

Besides, our study investigated the predictive value of the radiologist's tentative diagnosis of perforation for the first time to show whether it is feasible to rely on the assessment of highly trained paediatric radiologists. We were able to demonstrate that a suspected perforation was significantly associated with ACA with a sensitivity of 32% and specificity of 94%. The concordance rate of a suspected perforation by the paediatric radiologist and histopathology was 67%. However, the remaining patients had a phlegmonous appendicitis ($n = 29$), a gangrenous appendicitis ($n = 14$), or negative histopathology ($n = 5$). Because only 32% of ultrasound reports contained a tentative diagnosis of the radiologist, the true significance of this finding is unclear and needs to be verified in prospective studies.

Loss of the echogenic submucosal layer was a reproducible sonographic finding associated with perforation in previous studies.^{21,24} Xu et al even demonstrated that this characteristic is not only a sign of perforation, but also an indication of ACA including appendiceal gangrenes.²⁴ By evaluating the appendiceal wall oedema, we could not support these results.

An interesting finding in our study was the mean negative appendectomy rate of 21.8%. This was due to the overestimation of clinical signs of appendicitis in the first years of the retrospective study period (maximum 28.5% in 2009). The negative appendectomy rate was able to be substantially reduced down to 11.1% in the year 2015 through the use of primarily ultrasound-based decision making. This finding emphasizes the value of ultrasound investigation within the diagnostic process and decision making in appendicitis as a central imaging tool.

Our study has some limitations: First of all, this study was limited by its retrospective design so that ultrasound findings might not have been reported in full detail. Secondly, the investigated parameters were not standardised. Moreover, our retrospective analysis was limited due to the fact that the radiologists looked for signs of acute appendicitis without the need to specify different entities. Due to these limitations of our study, we plan a prospective study with a standardised investigation sheet. Hereby, we plan to simultaneously offer the possibility to investigate if there were other factors the radiologists considered to differentiate between the types of appendicitis, which led to

the high specificity of their prognosis. We hope to be able to add more information on ultrasound findings, for instance appendiceal intraluminal fluid in ultrasound examinations as this feature was considered important for differentiating between AUA and ACA.¹⁵

CONCLUSION

In conclusion, our results show that ultrasound is not only helpful for differentiating between unperforated and perforated appendicitis, but also plays an important role in predicting complicated appendicitis including gangrenes and perforation. Not only are factors such as an increased appendiceal diameter, periappendiceal fat inflammation and the presence of an appendicolith significantly associated with ACA, but so is a

sonographically suspected perforation conducted by a paediatric radiologist. Therefore, all of the afore mentioned can act as major guiding characteristics for a physician when planning adequate treatment.

ACKNOWLEDGMENT

The authors want to thank Konrad Neumann, Department of Biometry and Clinical Epidemiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin (Germany) for his support with statistics.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- Rubér M, Andersson M, Petersson BF, Olaison G, Andersson RE, Ekerfelt C. Systemic Th17-like cytokine pattern in gangrenous appendicitis but not in phlegmonous appendicitis. *Surgery* 2010; **147**: 366–72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.09.039>
- Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int* 2019; **35**: 335–340Epub ahead of print. doi: <https://doi.org/10.1007/s00383-018-4423-1>
- Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr* 2018; **14**: 504–9. doi: <https://doi.org/10.1007/s12519-018-0173-3>
- Rubér M, Berg A, Ekerfelt C, Olaison G, Andersson RE. Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis. *Clin Exp Immunol* 2006; **143**: 117–24. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02957.x>
- Andersson R, Hugander A, Thulin A, Nyström PO, Olaison G. Indications for operation in suspected appendicitis and incidence of perforation. *BMJ* 1994; **308**: 107–10. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6921.107>
- Imaoka Y, Itamoto T, Takakura Y, Suzuki T, Ikeda S, Urushihara T. Validity of predictive factors of acute complicated appendicitis. *World J Emerg Surg* 2016; **11**: 1–5. doi: <https://doi.org/10.1186/s13017-016-0107-0>
- Rentea RM, Peter SDS, Snyder CL. Pediatric appendicitis: state of the art review. *Pediatr Surg Int* 2017; **33**: 269–83. doi: <https://doi.org/10.1007/s00383-016-3990-2>
- Rentea RM, St Peter SD. Contemporary management of appendicitis in children. *Adv Pediatr* 2017; **64**: 225–51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2017.03.008>
- Linnaus ME, Ostlie DJ. Complications in common General pediatric surgery procedures. *Semin Pediatr Surg* 2016; **25**: 404–11. doi: <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2016.10.002>
- Svensson JF, Patkova B, Almström M, Naji H, Hall NJ, Eaton S, et al. Nonoperative treatment with antibiotics versus surgery for acute nonperforated appendicitis in children: a pilot randomized controlled trial. *Ann Surg* 2015; **261**: 67–71. doi: <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000835>
- López JJ, Deans KJ, Minnici PC. Nonoperative management of appendicitis in children. *Curr Opin Pediatr* 2017; **29**: 358–62. doi: <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000487>
- Steiner Z, Buklan G, Gutermacher M, Litmanovitz I, Landa T, Arnon S. Conservative antibiotic treatment for acute uncomplicated appendicitis is feasible. *Pediatr Surg Int* 2018; **34**: 283–8. doi: <https://doi.org/10.1007/s00383-018-4226-4>
- Hartwich J, Luks FI, Watson-Smith D, Kurkchubasche AG, Muratore CS, Wills HE, et al. Nonoperative treatment of acute appendicitis in children: a feasibility study. *J Pediatr Surg* 2016; **51**: 111–6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.024>
- Hall NJ, Eaton S, Abbo O, Arnaud AP, Beaudin M, Brindle MZani A, Davies D, Skarsgard E, 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; **118** 05 2017. doi: <https://doi.org/10.1136/bmjpo-2017-000028>
- Steiner Z, Buklan G, Stackievicz R, Gutermacher M, Litmanovitz I, Golani G, et al. Conservative treatment in uncomplicated acute appendicitis: reassessment of practice safety. *Eur J Pediatr* 2017; **176**: 521–7. doi: <https://doi.org/10.1007/s00431-017-2867-2>
- Knaapen M, van der Lee JH, Heij HA, van Heurn ELW, Bakx R, Gorter RR. Clinical recovery in children with uncomplicated appendicitis undergoing non-operative treatment: secondary analysis of a prospective cohort study. *Eur J Pediatr* 2019; **178**: 235–42. doi: <https://doi.org/10.1007/s00431-018-3277-9>
- Kim MS, Park HW, Park JY, Park H-J, Lee S-Y, Hong HP, et al. Differentiation of early perforated from nonperforated appendicitis: MDCT findings, MDCT diagnostic performance, and clinical outcome. *Abdom Imaging* 2014; **39**: 459–66. doi: <https://doi.org/10.1007/s00261-014-0117-x>
- Rosenbaum DG, Askin G, Beneck DM, Kovanlikaya A. Differentiating perforated from non-perforated appendicitis on contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Pediatr Radiol* 2017; **47**: 1483–90. doi: <https://doi.org/10.1007/s00247-017-3900-3>
- Gongidi P, Bellah RD. Ultrasound of the pediatric appendix. *Pediatr Radiol* 2017; **47**: 1091–100. doi: <https://doi.org/10.1007/s00247-017-3928-4>
- Carpenter JL, Orth RC, Zhang W, Lopez ME, Mangona KL, Guillerman RP. Diagnostic performance of US for differentiating perforated from Nonperforated pediatric appendicitis: a prospective cohort study. *Radiology* 2017;

- 282: 835–41. doi: <https://doi.org/10.1148/radiol.2016160175>
21. Blumfield E, Nayak G, Srinivasan R, Muranaka MT, Blitman NM, Blumfield A, et al. Ultrasound for differentiation between perforated and nonperforated appendicitis in pediatric patients. *AJR Am J Roentgenol* 2013; **200**: 957–62. doi: <https://doi.org/10.2214/AJR.12.9801>
 22. Tulin-Silver S, Babb J, Pinkney L, Strubel N, Lala S, Milla SS, et al. The challenging ultrasound diagnosis of perforated appendicitis in children: constellations of sonographic findings improve specificity. *Pediatr Radiol* 2015; **45**: 820–30. doi: <https://doi.org/10.1007/s00247-014-3232-5>
 23. Blumfield E, Yang D, Grossman J. Scoring system for differentiating perforated and non-perforated pediatric appendicitis. *Emerg Radiol* 2017; **24**: 547–54. doi: <https://doi.org/10.1007/s10140-017-1535-1>
 24. Xu Y, Jeffrey RB, Chang ST, DiMaio MA, Olcott EW. Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated appendicitis: implications for Antibiotics-First therapy. *J Ultrasound Med* 2017; **36**: 269–77. doi: <https://doi.org/10.7863/ultra.16.03109>
 25. Fallon SC, Kim ME, Hallmark CA, Carpenter JL, Eldin KW, Lopez ME, et al. Correlating surgical and pathological diagnoses in pediatric appendicitis. *J Pediatr Surg* 2015; **50**: 638–41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.11.001>
 26. Kim MS, Kwon H-J, Kang KA, Do I-G, Park H-J, Kim EY, et al. Diagnostic performance and useful findings of ultrasound re-evaluation for patients with equivocal CT features of acute appendicitis. *Br J Radiol* 2018; **91**: 20170529. doi: <https://doi.org/10.1259/bjr.20170529>
 27. Nicole M, Desjardins MP, Gravel J. Bedside sonography performed by emergency physicians to detect appendicitis in children. *Acad Emerg Med* 2018; **25**: 1035–41. doi: <https://doi.org/10.1111/acem.13445>
 28. Park NH, Park CS, Lee EJ, Kim MS, Ryu JA, Bae JM, et al. Ultrasonographic findings identifying the faecal-impacted appendix: differential findings with acute appendicitis. *Br J Radiol* 2007; **80**: 872–7. doi: <https://doi.org/10.1259/bjr/80553348>
 29. Mahida JB, Lodwick DL, Nacion KM, Sulkowski JP, Leonhart KL, Cooper JN, et al. High failure rate of nonoperative management of acute appendicitis with an appendicolith in children. *Journal of Pediatric Surgery* 2016; **51**: 908–11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.02.056>
 30. Gonzalez DO, Lawrence AE, Cooper JN, Sola R, Garvey E, Weber BC, et al. Can ultrasound reliably identify complicated appendicitis in children? *J Surg Res* 2018; **229**: 76–81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.03.012>

2.2. Anwendung und Untersuchung neuer Verfahren zur Differenzierung der Entitäten der Appendizitis

2.2.1. Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens auf diagnostische Routineparameter

P4 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;14(9):e0222030. Doi: 10.1371/journal.pone.0222030

Die klinische Untersuchung ist durch eine große Variabilität zwischen den Untersuchern und die Notwendigkeit der Interpretation bereits zur Diagnose der akuten Appendizitis ohne weitere Differenzierung regelmäßig überfordert. Zudem konnten wir in den Vorarbeiten zeigen, dass die etablierten Parameter der Labor- und bildgebenden Diagnostik für sich allein genommen zwar hinsichtlich der Entitäten hinweisgebend sind, aber keine zuverlässige Differenzierung für die klinische Anwendung zulassen. In der folgenden Arbeit wurde daher ein Untersucher-unabhängiger Ansatz mittels der Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz (KI) und des maschinellen Lernens (ML) auf objektive routinediagnostische Parameter getestet. Diese haben für sich allein genommen keine ausreichende Trennschärfe zur prätherapeutischen Differenzierung der histopathologisch definierten Entitäten: das Differenzialblutbild, das C-reaktive Protein (CRP) und der Durchmesser der Appendix in der Ultraschalluntersuchung. Insgesamt wurden Daten von 590 Patienten in die Analyse mittels eines *supervised learning* Algorithmus einbezogen. Hiervon wurden die Daten von 35% der Patient*innen zum Training des Klassifikationsmodells verwendet und die Daten der verbleibenden 65% der Patient*innen zur Validierung des Modells genutzt.

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Methoden der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens die Fähigkeit, zwischen unkomplizierter und komplizierter Appendizitis zu differenzieren, im Vergleich zur bisherigen Standarddiagnostik auf der Basis isolierter Parameter, deutlich erhöhen.

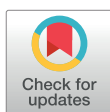
RESEARCH ARTICLE

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



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](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), 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

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.

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 Schad 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.

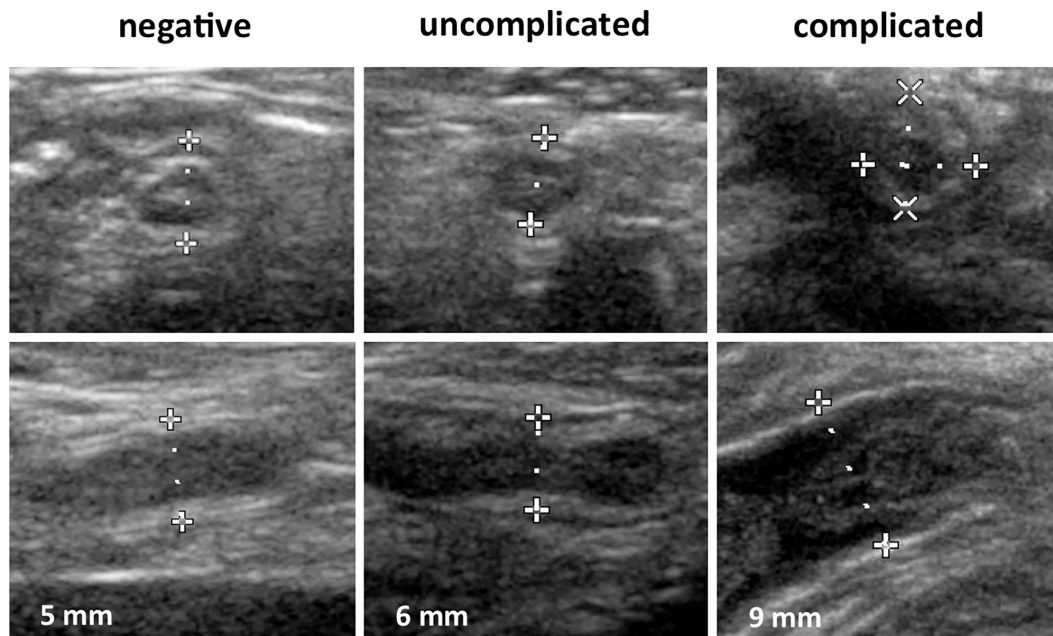


Fig 1. Sonographic images of appendices from 8 years old female patients without inflammation, with uncomplicated and with complicated appendicitis; cross and longitudinal sections, respective maximum diameters [mm].

<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 $\{bm_1, \dots, bm_j, \dots, bm_m\}$ and then implement a binary classification problem fitting the parameters of a linear model on the discovery data $X_{\text{discovery}}$, whose columns p_{bmj} 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.

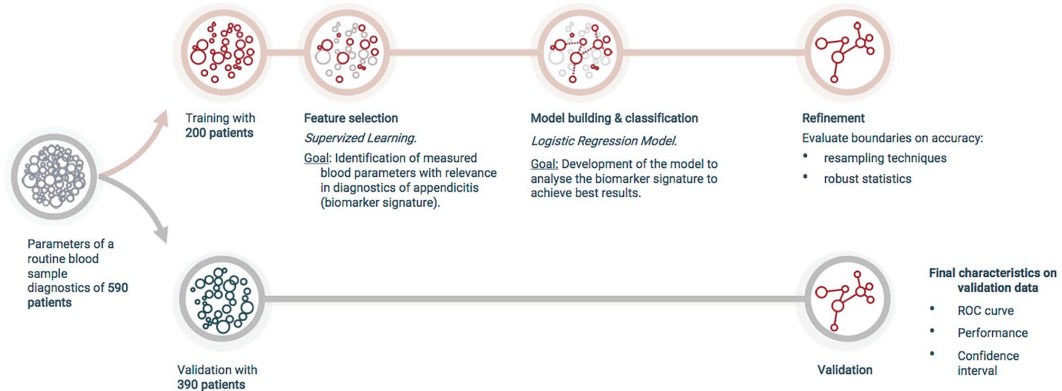


Fig 2. Illustration of development and validation of biomarker signatures.

<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

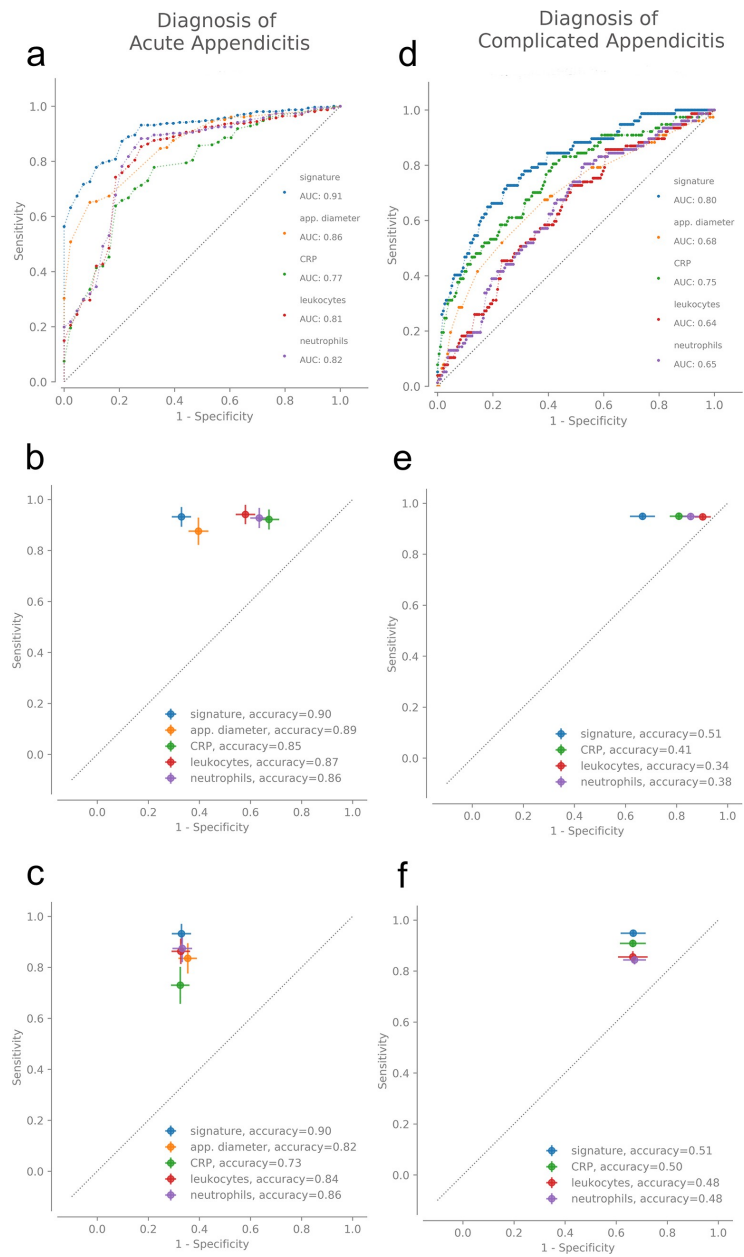


Fig 3. ROC curves. a: analysis of the predictive capacity for discrimination between appendicitis and normal appendix (biomarker signature vs. conventional values CRP, neutrophils, leukocytes and appendiceal diameter). b and c: best cut-off biomarker signature vs. respective sensitivities (b) and specificities (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-cnrcr2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cnrcr2820030106>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

2.2.2. Differenzierende genomweite Genexpressionsanalyse

P5 Kiss N, Minderjahn M, Reismann J, Svensson J, Wester T, Hauptmann K, Schad M, Kallarackal J, von Bernuth H, Reismann M. Use of gene expression profiling to identify candidate genes for pretherapeutic patient classification in acute appendicitis. *BJS Open*. 2021;5(1):zraa045. Doi: 10.1093/bjsopen/zraa045

Da die Studienlage auf immunologische Unterschiede von Patient*innen mit unkomplizierter und komplizierter Appendizitis hinweist, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine prospektive genomweite Genexpressionsanalyse von Patient*innen mit phlegmonöser und gangränöser Appendizitis.

Ziel war es, pathophysiologische Einblicke in das Krankheitsbild der akuten Appendizitis zu erlangen. Es sollte zum einen die Untersuchung der Unterschiede in der Genexpression bei Kindern mit unkomplizierter und komplizierter Appendizitis erfolgen. Zum anderen sollte die Untersuchung der Genexpression die Beschreibung spezifischer Pathophysiologien und insbesondere Unterschiede in Bezug auf immunologische Signalwege der Appendizitisentitäten ermöglichen.

Es erfolgte die prospektive genomweite Genexpressionsanalyse von 56666 Genen von 13 Patient*innen mit phlegmonöser und von 16 Patient*innen mit gangränöser Appendizitis. Die spezifisch immunologische Signalweganalyse erfolgte auf Basis der *generally applicable gene set enrichment method* nach Luo et al. (82).

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionen von immunologischen Signalwegen von Patient*innen mit phlegmonöser und gangränöser Appendizitis unterscheiden. In der Gruppe der phlegmonösen Appendizitiden handelt es sich um Genexpressionsmuster, die mit immunologischen Mechanismen vereinbar sind, die typischerweise mit einer viralen Infektion assoziiert sind, wohingegen bei der gangränösen Appendizitis Muster vorliegen, die am ehesten durch eine antibakterielle Abwehr erklärt sind.

Use of gene expression profiling to identify candidate genes for pretherapeutic patient classification in acute appendicitis

N. Kiss¹, M. Minderjahn¹, J. Reismann¹, J. Svensson², T. Wester², K. Hauptmann³, M. Schad⁴, J. Kallarackal⁴, H. von Bernuth⁵ and M. Reismann^{1,*}

¹Department of Paediatric Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

²Department of Paediatric Surgery, Astrid Lindgren Children's Hospital, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

³Institute of Pathology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

⁴OakLabs, Hennigsdorf, Germany

⁵Department of Paediatric Pulmonology and Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

*Correspondence to: Department of Paediatric Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany (e-mail: marc.reismann@charite.de)

Abstract

Background: Phlegmonous and gangrenous appendicitis represent independent pathophysiological entities with different clinical courses ranging from spontaneous resolution to septic disease. However, reliable predictive methods for these clinical phenotypes have not yet been established. In an attempt to provide pathophysiological insights into the matter, a genome-wide gene expression analysis was undertaken in patients with acute appendicitis.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells were isolated and, after histological confirmation of PA or GA, analysed for genome-wide gene expression profiling using RNA microarray technology and subsequent pathway analysis.

Results: Samples from 29 patients aged 7–17 years were included. Genome-wide gene expression analysis was performed on 13 samples of phlegmonous and 16 of gangrenous appendicitis. From a total of 56 666 genes, 3594 were significantly differently expressed. Distinct interaction between T and B cells in the phlegmonous appendicitis group was suggested by overexpression of T cell receptor α and β subunits, CD2, CD3, MHC II, CD40L, and the B cell markers CD72 and CD79, indicating an antiviral mechanism. In the gangrenous appendicitis group, expression of genes delineating antibacterial mechanisms was found.

Conclusion: These results provide evidence for different and independent gene expression in phlegmonous and gangrenous appendicitis in general, but also suggest distinct immunological patterns for the respective entities. In particular, the findings are compatible with previous evidence of spontaneous resolution in phlegmonous and progressive disease in gangrenous appendicitis.

Introduction

Surgeons know how to treat appendicitis: either surgically with appendectomy and supporting measures like abscess drainage, or conservatively without operation¹. Nevertheless, the optimal treatment depends on the stage or type of inflammation of the vermiform appendix.

The presence of necrosis seems to be the determining factor: necrotizing gangrenous appendicitis (GA) is associated with a complicated clinical course including increased rates of peritonitis and abscess formation, even if perforation is not present, whereas non-necrotizing, phlegmonous appendicitis (PA) usually seems to be self-limiting^{1–3}. Further insights into epidemiological aspects have shown that perforated and non-perforated appendicitis are characterized by independent frequencies within defined populations⁴. Histologically, perforated GA, referred to clinically as complicated appendicitis, seems to evolve much faster than previously thought, with increased risk of abscess formation up

to septic disease, and can rarely be prevented. In contrast, uncomplicated, non-perforated inflammation appears to be self-limiting, with spontaneously decreasing inflammatory values in a large proportion of those affected⁵. These epidemiological data are supported by evidence from an RCT⁵ comparing treatment results for patients who had been diagnosed with uncomplicated appendicitis, and were treated conservatively with or without antibiotics. Rates of treatment failure were comparable in the two arms (79.3 versus 76.6 per cent). Further support for the hypothesis of independent inflammatory entities is provided by immunological evidence. PA and GA differ significantly in terms of distinct underlying immunological patterns; there are primarily Th2-helper cell-dependent mechanisms in those with PA and Th1/Th17-dependent mechanisms in patients with gangrenous inflammation^{6,7}.

As the inflammatory entity seemingly determines the clinical course, these types of appendicitis require different therapeutic

Received: August 18, 2020. Revised: October 6, 2020. Accepted: October 24, 2020

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of BJS Society Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

courses of action. Therefore, decisive diagnostics are mandatory to reliably differentiate complicated from uncomplicated appendicitis.

Clinical investigation and laboratory values are basic methods used in the diagnosis of acute appendicitis⁸. In an analysis of the use of routine laboratory values (full blood count and C-reactive protein) for pretherapeutic prediction of PA and GA, the parameters tested did not provide a decisive distinction between the two, although steady pathophysiological differences between the histopathological entities were demonstrated⁹.

Currently, imaging techniques such as CT seem to provide good capacity for differentiation between complicated and uncomplicated appendicitis¹⁰. In a study¹¹ focused on the value of radiation-free sonography for differentiation of the inflammatory types in children, abdominal ultrasonography proved to be a valuable tool for the diagnosis of appendicitis, but was limited in terms of differentiation of the two entities. Application of artificial intelligence and methods of machine learning to the laboratory parameters and sonographically measured appendiceal diameters led to substantially improved capacity for the discrimination of PA and GA, and thereby computer algorithm-based biomarker signatures were established¹².

This comprehensive prospective whole-genome gene expression study essentially encompasses two objectives. First, the aim was to investigate the general extent of gene expression differences in children with PA and GA. Second, the entities were examined at a basic level of gene expression that would allow description of specific pathophysiological and, particularly, immunological differences in terms of pathways. Interesting differences between PA and GA have already been described at the genomic level¹³. The present description of dynamic gene expression level with subsequent pathway analysis for differential diagnosis of acute appendicitis is a novel approach.

Methods

This was a single-centre, prospective study of patients aged 7–17 years who had undergone surgery for acute appendicitis at the Department of Paediatric Surgery of Charité – Universitätsmedizin Berlin, between April and August 2019. The specific age group in this paediatric surgical population was determined as a necessary level of ability to consent and reading comprehension was required in order to be able to give informed consent to participate in the study. The study was approved for the limited number of patients (30 + expected exclusion rate of 10 per cent) by the institutional ethics committee (reference number ES2/130/16), with the perspective of a subsequent sample size calculation for a larger study.

Inclusion criteria for the study were: patients aged 7–17 years with a sonographically suspected diagnosis of acute appendicitis and scheduled for appendectomy⁵. Patients and parents were informed by means of appropriate age-adapted information sheets (children aged 7–14 and 15–17 years; separate leaflets for parents) to obtain informed consent. Patients were specifically asked to report the onset of abdominal pain (\pm 30 min). The interval between the start of symptoms and blood sample collection was calculated accordingly.

Exclusion criteria were: missing consent; concomitant disease; previous or present specific treatment for acute appendicitis (conservative or surgical); antibiotic treatment within the past 2 weeks; interval between blood sample collection and isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) more than 1 h;

insufficient RNA quality (RNA integrity number (RIN) below 7); and appendectomy not performed (no histopathological specimen).

In strict accordance with the ethics committee's approval, blood samples (at least 5 ml) were drawn during routine medical laboratory investigations in the paediatric emergency department. The isolation of PBMCs was performed within 1 h after blood sampling. The blood from each individual was suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at a 1 : 1 ratio. Density gradient centrifugation was performed using Ficoll[®] PM400 (GE Healthcare, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) at room temperature for 30 min at 400g. After isolation of the monocyte layer, the cells were resuspended in PBS and centrifuged twice for 5 min at 400g. After final resuspension in 1 ml PBS, centrifugation and removal of the supernatant, the native cells were frozen at -20°C using a sample freezing container (Mr. Frosty[™], Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) and finally stored at -80°C in liquid nitrogen.

Histopathological examination

After appendectomy, the resected appendixes were classified histopathologically according to Carr². PA is characterized by transmural infiltration of the appendix by neutrophilic granulocytes, serositis, microabscesses, and oedema, without gangrene or perforation. GA is especially characterized by ischaemic areas in the appendix with transmural myonecrosis. Perforated appendicitis is defined by gangrenous alterations with a transmural defect of the appendix wall. Fig. 1 shows the major histopathological features for group assignment (phlegmonous versus gangrenous) in comparison to normal appendix.

After the primary histopathological examination, a second blinded evaluation was undertaken by a specialized paediatric pathologist.

Laboratory workflow

Total RNA was isolated from PBMCs using a NucleoSpin[™] RNA Plus kit (Macherey-Nagel, Germany). RNA quality control was achieved using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and the RNA 6000 Pico Kit for total RNA samples. For quantitative control, photometric measurement was performed using a NanoDrop[™] 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). The quality of each sample was evaluated based on the Bioanalyzer RIN. Samples with a RIN above 7 fulfilled quality control and were subjected to labelling.

For labelling, a Low Input QuickAmp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to generate fluorescent complementary RNA (cRNA). A random primer-oligo-dT primer mixture was used for first-strand synthesis. After second-strand synthesis, *in vitro* transcription for synthesis of cRNA labelled with cyanine 3-CTP was performed.

Some 600 ng of each Cy3-labelled cRNA was hybridized at 65°C for 17 h on an OakLabs 8x60K ArrayXS Human Agilent microarray (design ID 79407) containing probes for 56 666 genes, using an Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), followed by microarray wash and scanning on a SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at a resolution of 3 μm to generate 20-bit TIF files according to the manufacturer's protocols.

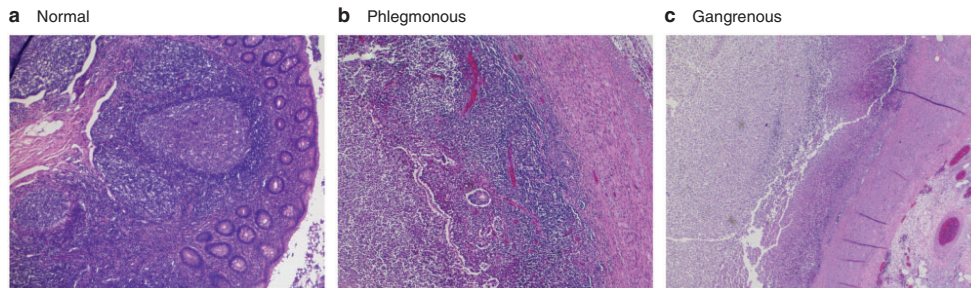


Fig. 1 Appendiceal histology

a Uninflamed appendix with normal lymphofollicular structures, **b** phlegmonous appendicitis with oedema and diffuse transmural granulocytic infiltration, and **c** gangrenous appendicitis with almost complete wall necrosis and fibrinous-purulent inflammation of serosa and adjacent fatty tissue

Microarray data analysis

TIF files were extracted using Feature Extraction Software version 11 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and the GE1_1105_Oct12 protocol. The resulting raw data were analysed using DirectArray Software (OakLabs, Henningsdorf, Germany). The signal distributions of the raw data were visualized using box plots to identify potential issues for individual samples.

Samples were quantile normalized and subjected to statistical analysis (PA versus GA) by applying Welch's test and calculating \log_2 fold changes for each gene. $P < 0.050$ was considered statistically significant.

Pathway analysis

Differentially expressed pathways were identified using the generally applicable gene set enrichment method of Luo and co-workers¹⁴ and the gage package in R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The following immunologically relevant pathways are referred to in this analysis: Toll-like receptor signalling pathway; antigen processing and presentation; NOD-like receptor signalling pathway; haematopoietic cell lineage; natural killer cell-mediated cytotoxicity; tumour necrosis factor (TNF) signalling pathway and intestinal immune network for IgA production; complement and coagulation pathways; retinoic acid-inducible gene (RIG) I-like receptor signalling pathway; cytosolic DNA-sensing pathway; C-type lectin receptor signalling pathway; T cell receptor signalling pathway; Th1 and Th2 cell differentiation; Th17 cell differentiation; interleukin (IL) 17 signalling pathway; FcεRI signalling pathway; FcγR-mediated phagocytosis; and chemokine signalling pathway.

The significantly differentially expressed genes from the relevant pathways were visualized in a heatmap. For the colour representation, Z-scores were calculated for each line; Z-scores represent differences between a gene's normalized signal for a sample and the gene's mean signal for all samples divided by the standard deviation. The absolute Z-value represents the distance between a sample's gene signal and the gene's mean signal of all samples in standard deviation units. A sample's gene signal below the mean Z-value indicates a negative (blue) signal, whereas a signal above the mean Z-value indicates a positive (red) signal. Heatmap visualization was combined with hierarchical clustering, whereby samples with the most similar expression profiles—based on normalized expression values—were clustered together. Additionally, clusters were visualised as dendrograms, complementing the heatmaps.

Results

Thirty-three otherwise healthy patients with sonographic suspicion of acute appendicitis were initially included. RNA quality control led to exclusion of four samples that had signs of degradation: three from patients with GA and one from a patient with PA. After primary routine histopathological examination, 15 specimens were classified as phlegmonous and 14 as gangrenous. After blind histopathological re-evaluation by a specialized paediatric pathologist, two samples from patients with a primary diagnosis of PA were classified as gangrenous inflammation. The PA group eventually consisted of 13 samples and the GA group of 16 (Fig. 2). No statistically significant differences were found with regard to age, sex distribution, and time from onset of symptoms to blood sample collection (Table 1).

Gene expression analysis

Box plots of raw gene expression signals of the samples finally included and classified showed a similar distribution, with no obviously problematic samples (Fig. S1).

From a total of 56 666 protein-coding and non-coding RNAs analysed, 3594 (6.3 per cent) were significantly differentially expressed between the groups ($P < 0.050$). The distribution of expression patterns (\log_2 fold change versus $-\log(P)$) with respect to significant upregulation and downregulation of genes is illustrated in a volcano plot (Fig. S2).

Expression patterns within immunological pathways

The following immunological pathways were significantly differentially expressed: Toll and Irg signalling pathway, antigen processing and presentation, NOD-like receptor signalling pathway, haematopoietic cell lineage, natural killer cell-mediated cytotoxicity, TNF signalling pathway and intestinal immune network for IgA production, complement and coagulation pathways, RIG-I-like receptor signalling pathway, Cytosolic DNA-sensing pathway, C-type lectin receptor signalling pathway, T cell receptor signalling pathway, Th1 and Th2 cell differentiation, Th17 cell differentiation, IL-17 signalling pathway, FcεRI signalling pathway, FcγR-mediated phagocytosis, and chemokine signalling pathway. Tables 2 and 3 show the significantly differentially regulated mRNAs. Information about the specific functions of the genes is provided in Table S1. Gene overexpression in the PA group was characterized by lymphoid cell lineage-directed patterns, specifically those involved in T cell/B cell

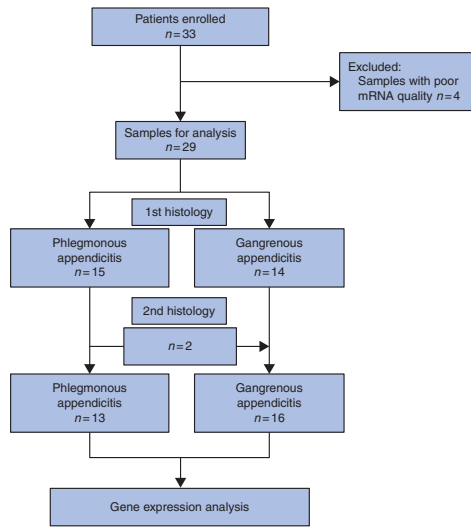


Fig. 2 Patient flow diagram

Table 1 Distribution of age, sex, and duration of symptoms before sample collection

	Total (n = 29)	Phlegmonous (n = 13)	Gangrenous (n = 16)
Age (years) ^a	11.3(2.6)	11.5(2.7)	11.1(2.6)
Sex ratio (F : M)	14 : 15	4 : 9	10 : 6
Duration of symptoms before sample collection (h)	28.3(16.9)	24.0(13.3)	32.1(19.4)

^aValues are mean(s.d.).

interactions. In contrast, the expression pattern in the GA group was primarily assigned to an antibacterial function.

Eleven of the significantly increased expressed genes in the PA group concerning α or β subunits of the T cell receptor were found within the top 100 expressed genes. In the GA group, two significantly increased mRNAs were found among the top 100: SOCS3 and neutrophilic CD64. Based on statistically significant P values within immunological pathways, a heat map for respective differentially expressed genes was created (Fig. 3).

Discussion

Diagnostic methods provide the framework for the surgical options for treatment of acute appendicitis. The authors' motivation beyond clarification of the pathophysiology was to show what could be expected from gene expression data in the diagnosis of acute appendicitis in the future, especially with regard to one of the most affected age groups. The medium-term goal is to obtain the simplest possible molecular marker providing the most valid information possible for rapid therapeutic decision-making. Such a marker should be safe, objective (without need for interpretation), easy to determine and, in terms of prospective informative value, superior to other diagnostic tools such as imaging, clinical examination, standard laboratory parameters, and combinatorial scores. The latter are especially useful, but they

Table 2 Significantly differentially expressed genes with immunological relevance: relative gene overexpression in patients with phlegmonous appendicitis

Gene	Mean signal PA	Mean signal GA	P [†]
MHC class II	142	65	0.043
HLA-F	2395	1585	0.024
HLA-DOB	185	119	0.017
CD40L	444	250	0.003
CD2	715	304	0.027
CD3	224	121	0.021
CD24	144	87	0.021
CD23	582	276	0.010
CD72	47	27	0.023
NIK	150	83	0.029
TRAF1	147	93	0.042
CD79 ^b	4384	3148	0.004
Pol-III	66	42	0.037
Interleukin 23	74	30	0.027
TCR β variable 2	19	7	0.012
TCR β variable 3-1	7	3	0.019
TCR β variable 4-2	45	29	0.013
TCR β variable 5-5 [*]	7	4	0.002
TCR β variable 5-6 [*]	11	5	< 0.001
TCR β variable 6	55	27	0.013
TCR β variable 6-5	31	11	0.024
TCR β variable 6-6	23	9	0.015
TCR β variable 6-8 [*]	35	13	0.003
TCR β variable 7-4	17	7	0.008
TCR β variable 7-7 [*]	7	2	< 0.001
TCR β variable 11-1 [*]	13	6	0.002
TCR β variable 11-3 [*]	6	2	0.003
TCR β variable 14	23	9	0.045
TCR β variable 15	6	2	0.019
TCR β variable 18	17	8	0.022
TCR β variable 29-1	51	23	0.036
TCR α variable 1-2	19	10	0.016
TCR α variable 2	10	5	0.021
TCR α variable 8-6	15	8	0.042
TCR α variable 10	6	4	0.026
TCR α variable 12-1 [*]	7	3	0.007
TCR α variable 12-2	19	11	0.032
TCR α variable 16	8	3	0.018
TCR α variable 17	17	10	0.044
TCR α variable 19 [*]	23	10	0.004
TCR α variable 22	19	10	0.042
TCR α variable 23	17	8	0.021
TCR α variable 24	9	5	0.019
TCR α variable 26-1	8	6	0.048
TCR α variable 35 [*]	7	3	0.006
TCR α variable 38-2	25	15	0.028
TCR α variable 41 [*]	18	11	0.003

^aGene expression within the top 100 differentially expressed genes (based on P values). PA, phlegmonous appendicitis; GA, gangrenous appendicitis.
[†]Welch's test.

represent complicated constructs with many variables, which have to be interpreted partially¹⁵.

Overall, 6.3 per cent of the genes analysed in this study were expressed significantly differently between the groups, demonstrating substantial differences among inflammatory entities. For complementary data analysis, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes was instrumentalized to map and link the disparate expressed genes to relevant molecular pathways. The results of this complex data analysis gave rise to the hypothesis that PA represents an immunological response to viral infections, whereas GA results in an expression pattern related to an antibacterial response.

Most theories generally designate luminal obstruction as the primary origin of acute appendicitis². In contrast, however,

studies have shown faecaliths in up to 27 per cent of all autopsies without inflammatory changes to the appendix, indicating that faecaliths are an incidental rather than a pathophysiologically causal finding in appendicitis specimens². Nevertheless, new insights into the pathophysiology of acute inflammation

of the vermiform appendix, which could replace the refuted theories, have been scarce.

In the present study, PA was characterized by lymphoid-directed gene expression patterns. Particularly, overexpression of α and β subunits of the T cell receptor, MHC class II and CD40L, T cell markers CD2 and CD3, and B-cell markers CD72 and CD79 in patients with PA suggested a specific immunological synapse between T and B cells^{16–20}. That seems to be essential for the activation of B cells and the induction of an antiviral humoral response; B cells are reciprocally activated by cytokines for antibody production upon virus internalization, degradation, MHC class II-dependent antigen presentation, and recognition by Th2 cells via the T cell receptor–CD3 complex. Co-stimulation is provided by CD40/CD40L and CD2^{19,20,16,17}. Overexpression of α and β subunits of the T cell receptor in the PA group only represented 11 per cent of the top 100 overexpressed genes. These results confirm previous findings regarding Th2 cell-dependent immunological mechanisms in patients with PA^{6,7}. In contrast, patterns associated with myeloid lineage were found in patients with gangrenous inflammation. The monocyte and neutrophil markers CD11b, CD16b, and CD64 point to a primarily antibacterial defence²¹. In particular, the significant upregulation of the bacterial pattern recognition receptors toll-like receptor (TLR) 5 and TLR-9 supports this interpretation^{22,23}. Consistent with the authors' theory, low antiviral function is demonstrated by overexpression of suppressor of cytokine signalling (SOCS) 3, which inhibits antiviral cytokine signalling²⁴. SOCS3 expression might even explain the relative overexpression of Th17 promoting interleukin 23 in patients with PA; SOCS3 is a potent negative regulator of

Table 3 Significantly differentially expressed genes with immunological relevance: relative gene overexpression in patients with gangrenous appendicitis

Gene	Mean signal PA	Mean signal GA	P†
CD11b	325	409	0.029
CD16b	1048	1678	0.032
CD35	437	658	0.022
CD55	1121	1540	0.032
CD36	2159	3046	0.023
TLR5	754	1134	0.011
TLR9	116	134	0.022
NLRP3	135	188	0.034
NLRP4	100	148	0.026
NLRP6	139	167	0.011
Cathelicidin	29	37	0.050
CD64	65	127	0.022
C9	68	87	0.032
SOCS3	1217	2366	0.010
IRAK4	260	327	0.030
Tpl2 kinase	188	324	0.037
IL-17A	196	251	0.048
LCN2	162	276	0.023

PA, phlegmonous appendicitis; GA, gangrenous appendicitis.
†Welch's test.

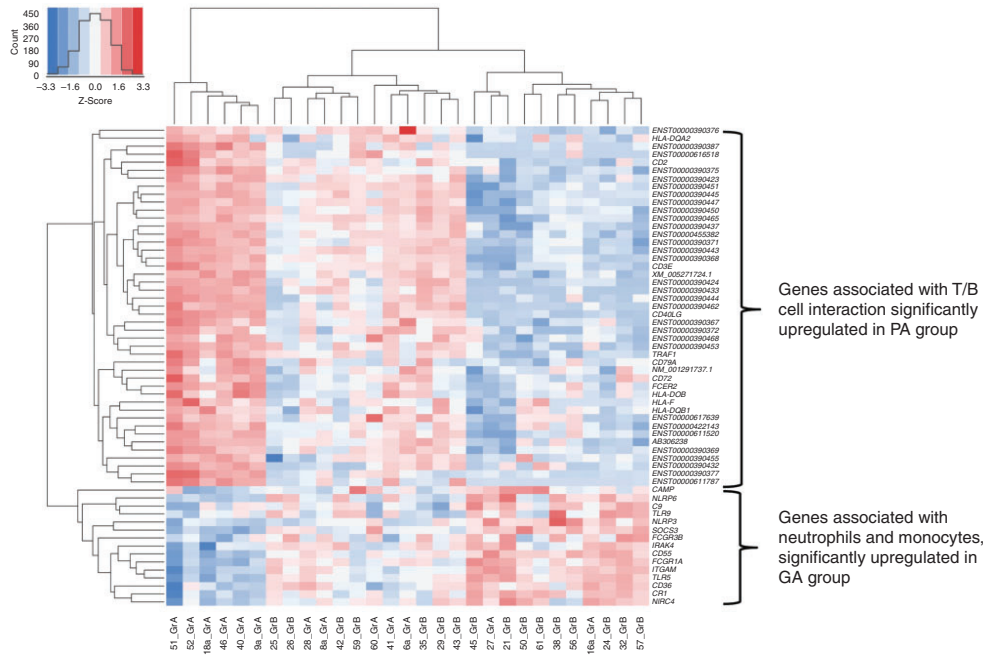


Fig. 3 Heat map visualizing cluster formation of samples with similar immunological expression patterns

Samples from patients with phlegmonous appendicitis (PA) (GrA) or gangrenous appendicitis (GA) (GrB). Signals above (red) and below (blue) the mean signal are shown.

Downloaded from https://academic.oup.com/ibj/open/article/5/1/znaa045/6073400 by guest on 28 July 2021

interleukin 23 expression²⁵. Thus, this seeming inconsistency might be explained by downregulation in GA rather than upregulation in PA.

Interestingly, the susceptibility of humans with the functional IL-17A rs2275913 polymorphism for appendicitis has been associated with advanced inflammation¹⁵. This finding correlates with the present observation of significantly enhanced IL-17A expression in patients with GA. Further to this, the pathway analysis especially contributes to the thesis of independent pathophysiological. The specific functions of genes not mentioned here are tabulated in [Table S1](#).

The study results are in accordance with previous immunological and infectiological investigations regarding acute appendicitis, and the authors' hypothesis that PA and GA represent independent entities. Mean symptom duration and distribution of temporal patterns were comparable in the two groups. These findings are consistent with previous evidence of independent inflammatory courses in patients with PA and GA, without transition from one form to the other^{3,4}.

Studies have shown that fetal development of the lymphatic tissue in the appendix is already characterized by persistence of T and B lymphocytes²⁶. As a result, maturation of the intestinal immune system does not seem to solely depend on microbial and nutritional antigens. The presence of T and B lymphocytes may be linked to current theories about the basic function of the human vermiform appendix, as it has been suggested to provide a 'safe house' for commensal bacteria in the gut, especially during the course of viral diarrhoea. Subsequently, the commensal bacteria are protected by a biofilm while the composition of the associated lymphatic tissue ensures its antiviral function²⁷. Indeed, several viruses, such as coxsackievirus, influenza virus, measles, cytomegalovirus, and adenovirus, have been associated with non-perforating inflammation of the appendix^{28,29}.

Microarray-based comparative investigation for pathway analysis has been shown previously to be a highly effective tool³⁰. However, despite numerous quality features such as its prospective design, the repeated histopathological assessment, strict quality control of the samples, and ambitious data analysis, the present study has essentially two limitations. Although expectations were met in terms of indicating substantial pathophysiological differences between PA and GA, a larger sample size could have revealed an even more comprehensive picture of the immunological pathways involved, as a large number of nearly statistically significant expression differences were found. Second, the inclusion of healthy patients as a control group could have provided more comprehensive insights.

The results presented here offer valuable information regarding the general description of differential gene expression and identification of specific yet independent immunological gene expression patterns in light of current research. They provide proof of concept for a comprehensive follow-up study with an adequate sample size calculation focusing on gene expression profiling, possibly coupled with high-performance algorithms, to allow successful development of a simple and reliable biomarker to distinguish inflammatory entities within acute appendicitis in childhood. The methods described here could therefore provide a fundamental framework for reliable diagnostics in acute appendicitis at a simple, low-invasive, low-risk, and cost-effective level.

Funding

HRH Crown Princess Lovisa's Foundation, Stockholm, Sweden.

Acknowledgements

N.K. and M.M. contributed equally to the manuscript. We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and the Open Access Publication Fund of Charité – Universitätsmedizin Berlin. The study received funding from HRH Crown Princess Lovisa's Foundation (Stockholm, Sweden). M.S. and J.K. are both owners of OakLabs. They were involved in the study design, gene expression and data analysis, decision to publish, and preparation of the manuscript. Their institution (not them personally) received funding for material costs and employee performance within the study.

Disclosure. The authors declare no other conflict of interest.

Supplementary material

Supplementary material is available at *BJS Open* online.

References

- Bhangu A, Søreide K, Di Saverio S, Assarsson JH, Drake FT. Acute appendicitis: modern understanding of pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet* 2015;**386**:1278–1287
- Carr NJ. The pathology of acute appendicitis. *Ann Diagn Pathol* 2000;**4**:46–58
- Andersson R, Hugander A, Thulin A, Nyström PO, Olaison G. Indications for operation in suspected appendicitis and incidence of perforation. *BMJ* 1994;**308**:107–110
- Andersson RE. The natural history and traditional management of appendicitis revisited: spontaneous resolution and predominance of prehospital perforations imply that a correct diagnosis is more important than an early diagnosis. *World J Surg* 2007;**31**: 86–92
- Park HC, Kim MJ, Lee BH. Randomized clinical trial of antibiotic therapy for uncomplicated appendicitis. *Br J Surg* 2017;**104**: 1785–1790
- Rubér M, Berg A, Ekerfeldt C, Olaison G, Andersson RE. Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis. *Clin Exp Immunol* 2006;**143**: 117–124
- Rubér M, Andersson M, Petersson BF, Olaison G, Andersson RE, Ekerfeldt C. Systemic Th17-like cytokine pattern in gangrenous appendicitis but not in phlegmonous appendicitis. *Surgery* 2010;**147**:366–372
- Andersson RE. Meta-analysis of the clinical and laboratory diagnosis of appendicitis. *Br J Surg* 2004;**91**:28–37
- Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr* 2018;**14**: 504–509
- Kim HY, Park JH, Lee SS, Lee WJ, Ko Y, Andersson RE et al. CT in differentiating complicated from uncomplicated appendicitis: presence of any of 10 CT features versus radiologists' gestalt assessment. *AJR Am J Roentgenol* 2019;**213**:W218–W227
- 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;**92**:20190102
- Reismann J, Romualdi A, Kiss N, Minderjahn MI, Kallarackal J, Schad M et al. Diagnosis and classification of pediatric acute appendicitis by artificial intelligence methods: an investigator-independent approach. *PLoS One* 2019;**14**:e0222030
- Dimberg J, Rubér M, Skarstedt M, Andersson M, Andersson RE. Genetic polymorphism patterns suggest a genetic driven

- inflammatory response as pathogenesis in appendicitis. *Int J Colorectal Dis* 2020;**35**:277–284
14. Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ. GAGE: Generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 2009;**10**:161
 15. Ateama JJ, van Rossem CC, Leeuwenburgh MM, Stoker J, Boermeester MA. Scoring system to distinguish uncomplicated from complicated acute appendicitis. *Br J Surg* 2015;**102**:979–990
 16. Szomolanyi-Tsuda E, Brien JD, Dorgan JE, Welsh RM, Garcea RL. The role of CD40-CD154 interaction in antiviral T cell-independent IgG responses. *J Immunol* 2000;**164**:5877–5882
 17. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 1988;**6**:629–662
 18. Oxenius A, Campbell KA, Maliszewski CR, Kishimoto T, Kikutani H, Hengartner H, Zinkernagel RM, Bachmann MF. CD40-CD40 ligand interactions are critical in T-B cooperation but not for other anti-viral CD4+ T cell functions. *J Exp Med* 1996;**183**:2209–18. doi: 10.1084/jem.183.5.2209
 19. Adachi T, Wakabayashi C, Nakayama T, Yakura H, Tsubata T. CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells. *J Immunol* 2000;**164**:1223–1229
 20. Chu PG, Arber DA. CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;**9**:97–106
 21. Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L. Update on neutrophil function in severe inflammation. *Front Immunol* 2018;**9**:2171
 22. Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* 2012;**335**:859–864
 23. El Kebir D, József L, Pan W, Wang L, Filep JG. Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling. *J Immunol* 2009;**182**:4386–4394
 24. Song MM, Shuai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 1998;**273**:35 056-35 062
 25. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu B-M, Tato C et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:8137–8142
 26. Bhide SA, Wadekar KV, Koushik SA. Peyer's patches are precocious to the appendix in human development. *Dev Immunol* 2001;**8**:159–166
 27. Laurin M, Everett M, Lou, Parker W. The cecal appendix: one more immune component with a function disturbed by post-industrial culture. *Anat Rec* 2011;**294**:567–579
 28. Alder AC, Fomby TB, Woodward WA, Haley RW, Sarosi G, Livingston EH. Association of viral infection and appendicitis. *Arch Surg* 2010;**145**:63–71
 29. Lamps LW. Infectious causes of appendicitis. *Infect Dis Clin North Am* 2010;**24**:995–1018
 30. Tang BMP, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RCY. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;**176**:676–684

2.2.3. Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens auf Genexpressionsdaten

P6 Reismann J, Kiss N, Reismann M. The application of artificial intelligence methods to gene expression data for differentiation of uncomplicated and complicated appendicitis in children and adolescents – a proof of concept study. *BMC Pediatrics*. 2021;21(1):268. Doi: 10.1186/s12887-021-02735-8

Die in der vorherigen Arbeit beschriebene genomweite Genexpressionsanalyse hat Hinweise auf unterschiedliche immunologische Signalwege in der Pathophysiologie der phlegmonösen und gangränösen Appendizitis nahegelegt. In der nun folgenden Arbeit wurden die Methoden der künstlichen Intelligenz auf die Genexpressionsdaten zur Unterscheidung von phlegmonöser und gangränöser Appendizitis angewendet. Es handelte sich um eine Proof-of-Concept-Studie, in der die grundsätzliche Anwendbarkeit von Methoden der künstlichen Intelligenz auf Genexpressionsdaten gezeigt werden sollte. Das Ziel war dabei – ähnlich wie in Publikation **P4** – die Entwicklung einer spezifischen Biomarkersignatur, die am besten in der Lage ist, die beiden histopathologisch definierten Entitäten zu differenzieren. Ein formaler Unterschied zur Anwendung der Methode auf die aktuell etablierten routinediagnostischen Parameter bestand allerdings insbesondere in der deutlich größeren zur Verfügung stehenden Datenmenge im Rahmen der Genexpressionsanalyse.

Hierfür wurde das bereits in **P4** angewendete Verfahren des maschinellen Lernens auf die Genexpressionsdaten von 56666 Genen von 13 Patient*innen mit phlegmonöser und 16 Patient*innen mit gangränöser Appendizitis angewendet. Bei der limitierten Patientenzahl wurde im Rahmen des Proof-of-Concept-Ansatzes das Resampling-Verfahren Bootstrap angewendet. Bei dem Verfahren wird die Datenmenge künstlich vergrößert, indem aus der bestehenden Stichprobe eine große Zahl von (Pseudo)Stichproben auf der Basis einer angenommenen (empirischen) Verteilungsfunktion gezogen wird.

Im Rahmen des experimentellen Settings hat sich eine bestmöglich differenzierende Biomarkersignatur bestehend aus folgenden 4 Genen ergeben: *ERGIC and golgi 3, regulator*

of G-protein signaling 2, Rho GTPase activating protein 33 und Golgi Reassembly Stacking Protein 2.

Es wurde somit gezeigt, dass die Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz auf Genexpressionsdaten grundsätzlich machbar ist.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The application of artificial intelligence methods to gene expression data for differentiation of uncomplicated and complicated appendicitis in children and adolescents - a proof of concept study –



Josephine Reismann, Natalie Kiss and Marc Reismann*

Abstract

Background: Genome wide gene expression analysis has revealed hints for independent immunological pathways underlying the pathophysiologies of phlegmonous (PA) and gangrenous appendicitis (GA). Methods of artificial intelligence (AI) have successfully been applied to routine laboratory and sonographic parameters for differentiation of the inflammatory manifestations. In this study we aimed to apply AI methods to gene expression data to provide evidence for feasibility.

Methods: Modern algorithms from AI were applied to 56.666 gene expression data sets from 13 patients with PA and 16 with GA aged 7–17 years by using resampling methods (bootstrap). Performance with respect to sensitivities and specificities were investigated with receiver operating characteristic (ROC) analysis.

Results: Within the experimental setting a best performing discriminatory biomarker signature consisting of a set of 4 genes could be defined: *ERGIC and golgi 3, regulator of G-protein signaling 2, Rho GTPase activating protein 33, and Golgi Reassembly Stacking Protein 2*. ROC analysis showed a mean area under the curve of 84%.

Conclusions: Gene expression based application of AI methods is feasible and represents a promising approach for future discriminatory diagnostics in children with acute appendicitis.

Keywords: Appendicitis, Children, Artificial intelligence, Gene expression

Background

Due to new conservative modalities for the treatment of uncomplicated acute appendicitis, current strategies for the distinguishment of high risk and low risk acute appendicitis are under pressure. Successful and safe application of conservative antibiotic treatment for clinically uncomplicated appendicitis has been demonstrated

[1]. Even frequent spontaneous resolution of histologically phlegmonous appendicitis has been claimed [2]. However, wrong indication for conservative therapy in cases of underestimated complicated appendicitis can possibly have serious consequences [3].

New evidence on the pathophysiology of acute appendicitis has led to the concept of risk being given more weight without complications having actually (already) occurred. This attitude is especially due to evidence on substantial epidemiological and immunological differences between histopathological phlegmonous and gangrenous

* Correspondence: marc.reismann@charite.de
Department of Pediatric Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

appendicitis [4–7]. However, the histopathological level at which complications are more likely to be expected is still matter of debate. Thus, in the current literature, phlegmonous inflammation of the appendix is still considered to be associated with a higher rate of complications [8]. Current studies contradict this view. Phlegmonous (PA) and necrotizing gangrenous appendicitis (GA) are not only characterized by different immunological but also by distinct and time stable laboratory patterns [4–7]. Indeed, the clinically relevant distinctive histopathological level seems to be expected at the stage of necrotic gangrene [9]. In a recent study hyponatremia has turned out as a promising parameter for delineation of perforated appendicitis [10]. A high decisive degree for the diagnosis of perforation can also be reached with advanced combinatory tools as the appendicitis inflammatory response (AIR) score [11]. However, clear demarcation of appendicitis at the earlier stage of non-perforated gangrene would even expand the scope for therapeutic action with the aim to avoid the most severe complications.

In a prospective study with genome wide gene expression analysis in children with acute appendicitis showed clearly distinguishable pictures within an immunological pathway analysis [12]. Gene expression patterns in patients with phlegmonous appendicitis were highly suspicious for activation of antiviral immunological mechanisms, while patterns in patients affected by gangrenous inflammation can be generally characterized as antibacterial.

However, safe differentiation for clinical decision making is still a great challenge. Clinical examination is characterized by a great interobserver variability with low discriminatory capacity [13], laboratory values vary too widely for safe differentiation [6, 13] and imaging techniques like ultrasound show promising results with respect to the significance of particular parameters, but are dependent on the expertise of and interpretation by the investigator [14].

In a recently published study, laboratory cellular parameters from full blood counts, C-reactive Protein (CRP) and the sonographically measured appendiceal diameter were used within modern algorithms from machine learning and artificial intelligence for the differentiation of phlegmonous and gangrenous appendicitis [15]. The predictive capacity could be substantially improved compared with that of the single parameters in this experimental setting.

The aim of the current study was to investigate the applicability of algorithms from machine learning and artificial intelligence to the extended pool of data from whole genome gene expression analysis for pretherapeutic differentiation of phlegmonous and gangrenous appendicitis in children and adolescents.

Methods

This prospective study included children aged 7–17 years, which presented with signs of acute appendicitis at the Department of Pediatric Surgery of Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany, between April 2019 and August 2019. Ethical approval was provided by the local ethics committee (reference number ES2/130/16). Due to ethical concerns regarding a gene expression study with underaged patients, the study population was restricted to a total number of 30 patients with an additional expected exclusion rate of 10%. The ability to give informed consent based on age adapted information sheets within this pilot study was expected at an age of 7 years. Thus, younger children were not considered. Patients with signs of acute appendicitis in ultrasound examination and planned appendectomy were enrolled in the study using respective information sheets for informed consent (separate leaflets for children aged 7–14, for children aged 15–17 years and for parents). Inclusion criteria were written informed consent, performed appendectomy with histopathological examination, sufficient RNA quality (RNA integrity number over 7) and time period from blood sample collection till peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation less than 1 h. Exclusion criteria were previous conservative treatment of acute appendicitis, any concomitant disease or antibiotic treatment in the past 2 weeks.

All patients underwent standard laparoscopic appendectomy in general anesthesia with infraumbilical insertion of a 12 mm Hasson trocar for a 5 mm camera and of two 5 mm working trocars in the left and mid lower abdomen for 5 mm instruments. After establishment of a capnoperitoneum (10–12 mmHg) and bipolar dissection of the appendicular artery, the appendix was ligated with Röder-slings at its base, divided with scissors and removed via retrieval bag. A 5 mm stapler device was used for complicated appendicitis with necrotic appendix base. In case of free fluid irrigation with Ringer solution and respective suctioning was performed. Drains were consequently avoided.

Isolation of PBMCs and RNA

According to the ethical vote, blood samples (> 5 ml) were only collected during routine blood test at the emergency department. Isolation of PBMCs was carried out within 1 h after blood collection. Therefore, blood from each patient was suspended in phosphate-buffered saline (PBS, 1:1 ratio) followed by density gradient centrifugation (Ficoll PM400, GE Healthcare, Pittsburgh, PA; room temperature, 30 min at 400 g). Thereafter, the monocyte layer was re-suspended with PBS and centrifugated (twice, 5 min each at 400 g), followed by a final re-suspension with 1 ml PBS, centrifugation and removal of the supernatant. Native cells were frozen at – 20 °C (Mr.

Frosty, Waltham, MA) and finally stored at -80°C in liquid nitrogen. By using the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel, Germany) total RNA was isolated from the PBMCs. RNA quality control (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies; RNA 6000 Pico Kit) and RNA quantity control (Nanodrop 2000 spectrophotometer; Thermo Scientific) were performed. Samples displaying a Bioanalyzer's RNA integrity number (RIN) above seven fulfilled quality control standards and were labelled by generation of fluorescent cRNA (complementary RNA; Low Input QuickAmp Labeling Kit, Agilent Technologies). 1st strand synthesis using random primer/oligo-dT primer mixture, 2nd strand synthesis and synthesis of cRNA labelled with cyanine 3-CTP and were performed. Cy3 labelled cRNA (600 ng) was hybridized (65°C for 17 h; ArrayXS Human Agilent microarray; design ID 79407; Agilent Gene Expression Hybridization Kit, Agilent Technologies; Oak Labs, GmbH, Henningsdorf, Germany) followed by microarray wash and scanning (SureScan Microarray Scanner; Agilent Technologies). According to manufacture's protocols a resolution of 3- μm was used to generate 20 bit TIF files.

Histopathological examination

After appendectomy, the appendices were histopathologically examined by two pathologists of which the second examination was a blinded evaluation by a specialized pediatric pathologist. Thereafter, primary diagnosis had been corrected in two cases. Appendicitis was classified in accordance with Carr (9):

- phlegmonous appendicitis: transmural infiltration of the appendix by neutrophilic granulocytes, serositis, microabscesses and oedema without gangrene or perforation
- gangrenous appendicitis: ischemic areas in the appendix with transmural myonecrosis.
- perforated appendicitis: gangrenous alterations with transmural defect of the appendix wall

Microarray analysis

To obtain microarray data, the Feature Extraction Software V11 (Agilent Technologies) and GE1_1105_Oct12 protocol was used to extract TIF files. At OakLabs GmbH, Henningsdorf, Germany, the raw data was further analyzed using DirectArray Software. Box plots were used to visualize signal distributions of raw data and to identify potential issues for individual samples. For statistical analysis of gangrenous versus perforated appendicitis, samples were first quantile normalized and then analyzed using a Welch's test and calculating log₂ fold changes for each gene. The level of significance was $p < 0.05$.

Development of biomarker signatures for differentiation of phlegmonous and gangrenous appendicitis

A supervised learning algorithm was used to analyze gene expression data and to build a prediction model for diagnosis of appendicitis based on relevant biomarkers. Usually, this is a two-step process summarized as *discovery* and *validation* [15]. Due to a limited number of included patients, we favored the widely accepted resampling technique to alternate between the discovery and the validation phase in up to thousand iterations. Thus, to develop biomarkers in this experimental setting, resampling was performed with the bootstrap method for dataset augmentation: Input data consisted of a large number of subsets of samples for varying threshold values. Model building with biomarker selection was carried out on a portion of these data ("discovery set") with measurement of the performance in an independent data set ("validation set"). Input data consisted of n samples, each of these described by a set of p variables – represented by the biomarker values. Concretely, the data matrix consisted of n lines and p columns. Then, relevant biomarkers were identified: a sequence of distinct biomarker signatures $\{bm_1, \dots, bm_p, \dots, bm_m\}$ was built and subsequent implementation of a binary classification problem was performed, fitting the parameters of a logistic regression model on the discovery data $X_{\text{discovery}}$ whose columns p_{bmj} were filtered according to the biomarker signatures. The quality of each biomarker signature was measured on the discovery data, while all performance values were obtained by measurement of the trained model on the validation data [15].

After definition of the best model, it was used to predict the diagnostic status of a patient with class probability. Output class probabilities can be interpreted as separation thresholds between class prediction. The thresholds represent trade-offs for the model to predict true/false positive and true/false negative rates. The diagnostic ability of the model with regard to sensitivities and specificities was tested on the validation dataset: true and false positive rates were counted at different thresholds [15]. For illustration of the results, a receiver operating characteristic (ROC) plot was created.

The primary endpoint of the study was the pretherapeutic distinctness of the histopathological entities demonstrated by an area under the curve (AUC) in the ROC analysis exceeding at least 50%. A relevant decisive degree was assumed at an AUC of at least 80%.

Statistical analysis

Regarding evaluation of the artificial intelligence approach concerning effective differentiation of the inflammatory entities, bootstrapping allowed for the calculation of standard errors and confidence intervals.

Statistical analysis regarding epidemiological and routine laboratory data was performed with Mann-Whitney-U-test for continuous and Chi-Square-test for categorical parameters. Welch's t-test was used for statistical analysis of gene expression values after quantile normalization as previously described [10]. Values are shown as percentages or mean \pm SD. Level of significance was $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software (version 9.1.0, La Jolla, CA).

Results

Patients and samples

Epidemiological data have already been published elsewhere [12]. Acute appendicitis was suspected sonographically in 33 otherwise healthy patients. After primary inclusion following informed consent, four cell samples (three samples of patients with GA, one of a patient with PA) were secondarily excluded due to signs of degradation within the RNA quality control. After two histopathological examinations the PA group consisted of 13 and the GA group of 16 samples. Mean age in the PA group was 11.5 ± 2.7 years and in the GA group 11.1 ± 2.6 years. Gender distribution was as follows: 4 patients in the PA group were female and 9 male, in the GA group 10 patients were female and 6 male. Mean CRP was significantly upregulated in patients with GA compared with those affected by PA (71.4 ± 58.81 mg/L vs. 23.05 ± 19.26 mg/L, $p < 0.05$). Mean eosinophilic granulocytes were significantly upregulated in patients with PA compared with patients with GA (0.8 ± 0.1 vs. 0.6 ± 0.18 , $p < 0.05$) without any other significant differences in the differential blood counts.

Patient demographics, distribution of histopathological entities and mean symptom durations are illustrated in Table 1.

Biomarker signatures for differentiation of phlegmonous and gangrenous appendicitis

As published previously, out of a total of 56,666 analyzed genes 3594 (6.3%) were significantly differentially

expressed [12]. Resampling allowed the definition of a best performing discriminatory biomarker signature which consisted of a set of four genes from of a total of 56,666 genes: *ERGIC and golgi 3, regulator of G-protein signaling 2, Rho GTPase activating protein 33, and Golgi Reassembly Stacking Protein 2*. Figure 1 displays the receiver operating characteristic curve with illustration of the particular sensitivities and specificities of the analyzed thresholds after resampling (mean values \pm SE). The area under the curve (AUC) was 84% (SE 8, CL 68.2).

Discussion

Reliable differentiation of the inflammatory entities within acute appendicitis is mandatory for safe performance of new conservative treatment strategies. Several studies have attempted to increase the validity of currently established routine methods with regard to the pretherapeutic differentiation between complicated and uncomplicated appendicitis. But especially the great number of publications which are concerned with this question might be a sign for the fact that this problem is still unsolved.

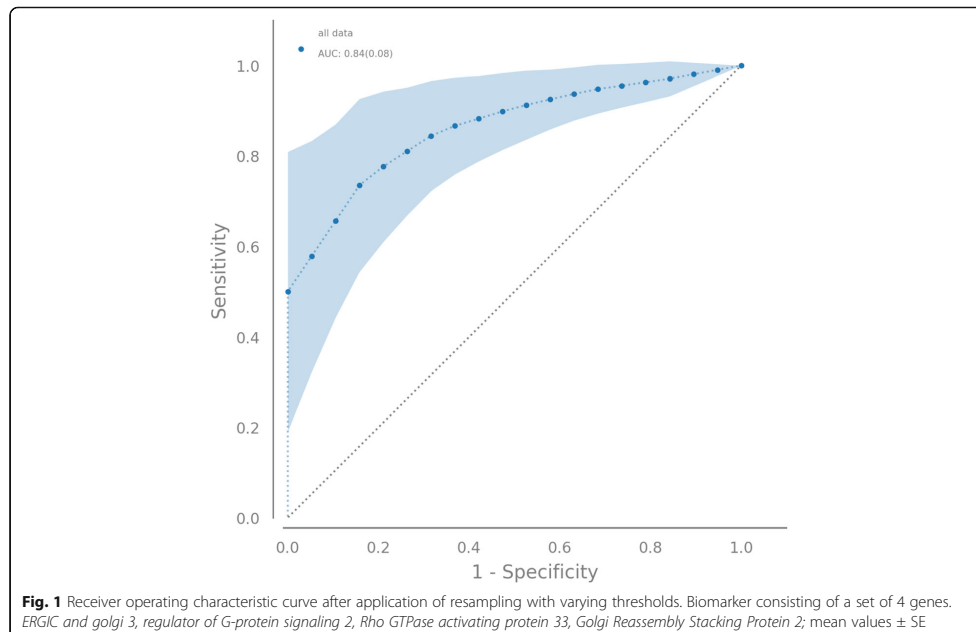
In particular, we identified two obstacles in previous attempts to resolve this issue. First, up to now the level at which the distinction should be made has not been convincingly shown – at the level of clinical judgement or at that of histopathological examination. And second: The discriminatory capacity of the established diagnostic methods is far too low with respect to the needed sensitivities and specificities. Clinical examination and imaging techniques are severely limited by interobserver reliability and need for interpretation, currently used laboratory values are restricted by a substantial indistinctness [6, 13, 14].

Increasing epidemiological, immunological and even gene expression evidence strongly suggests that acute appendicitis should be differentiated with respect to expected courses (uncomplicated vs. complicated) at the histopathological levels of phlegmone and gangrene. Phlegmonous appendicitis is most probably an own entity based on a distinct pathophysiology, possibly related to viral infection [4, 5, 12]. In contrast, gangrenous appendicitis is an own necrotic manifestation with strong immunological signs of bacterial origin [4, 5, 12]. Although clinically hardly distinguishable over a period of time, gangrenous inflammation comprises a substantially increased risk for complicated courses, while phlegmonous disease is comparably harmless and can be treated conservatively or even resolves by itself [2, 7, 16]. In order to provide best care for patients - in our case affected children - the distinguishment should be already effective at an early stage at which the entities might eventually not yet be distinguishable with current means.

Table 1 Epidemiological data and symptom duration until sample collection

	total (n = 29)	phlegmonous (n = 13)	gangrenous (n = 16)
Mean age (years)	11.3 \pm 2.6	11.5 \pm 2.7	11.1 \pm 2.6
Gender			
Female	14 (48%)	4 (31%)	10 (62.5%)
Male	15 (52%)	9 (69%)	6 (37.5%)
Duration of symptoms (hours)	28.3 \pm 16.9	24 \pm 13.3	32.1 \pm 19.4

Mean values \pm SD or total numbers and percentages



Application of supervised learning algorithms to gene expression data with focus on targets for therapeutic intervention and biomarkers for early diagnosis has already been successfully performed in other contexts like sepsis [17]. It was previously shown that methods of machine learning and artificial intelligence can be used to substantially improve the significance of routine inflammatory values and the sonographically measured appendix diameter within biomarker signatures for the differentiation of histologically phlegmonous and gangrenous appendicitis in children [15]. In the herewith presented approach the experimental biomarker signature with a total of 29 patients reached an AUC of 84% - even slightly outperforming that of the previously published application of artificial intelligence to routine values with its 590 included patients (AUC 80%) [15].

Interestingly, the particular underlying expressions of the particular genes in the biomarker signature (*ERGIC* and *golgi 3*, *regulator of G-protein signaling 2*, *Rho GTPase activating protein 33*, *Golgi Reassembly Stacking Protein 2*) are involved in cellular functions affecting cytoskeleton formation, regulation of GTP binding, membrane trafficking and cell signalling [18]. Unlike the other included genes, *ERGIC* and *golgi 3* is not significantly differentially regulated ($p > 0.05$). This finding demonstrates that the diagnostic horizon, which is usually limited to standard parameters when purely statistical

methods are used, is expanded through the use of artificial intelligence. However, as these cellular functions take place on a very basic level, interpretation is not easy and cannot be provided at this stage.

The comparability of the present approach with other studies is limited. It represents a purely experimental procedure in terms of a proof-of-concept study with a limited number of patients.

Conclusion

Although the presented investigation is best characterized as a simulation with artificial augmentation of data sets, the results justify the application of supervised learning algorithms with regular training and validation sets to gene expression data of a greater number of patients in order to gain the necessary level of distinguishability of the inflammatory entities. Although the presented results are already very promising, the combination of gene expression data with other largely objective parameters like the sonographically measured appendiceal diameter within artificial intelligence strategies might even substantially improve the efficacy of the method.

Abbreviations

AI: Artificial intelligence; PA: Phlegmonous appendicitis; GA: Gangrenous appendicitis; CRP: C-reactive protein; RNA: Ribonucleic acid; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; ROC: Receiver operating characteristic

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Martina Schad and Dr. Jim Kallarackal, OakLabs GmbH, Henningsdorf, Germany, for performance of high quality gene expression analysis and great support with the development of the biomarker signature.

Authors' contributions

JR contributed to the data analysis and interpretation and to the drafting of the article. NK contributed to data acquisition, analysis and interpretation. MR contributed to the study conceptualization and design, and to data acquisition, analysis and interpretation. All authors read and approved the manuscript.

Funding

Kronprinsessan Lovisas förening för barnsjukvård, Stockholm, Sweden (2018–00429). The funder did not play a role in any aspect of the study, including design, data collection, analysis or manuscript writing. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Availability of data and materials

The datasets generated and analyzed during the current study are available in the Open Science framework repository (www.osf.io) under the URL <https://osf.io/xwnr3/>.

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

The study protocol was approved by the research Ethics Committee of Charité – Universitätsmedizin Berlin (reference number ES2/130/16). All study procedures were in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all study participants and their guardians.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Received: 19 April 2021 Accepted: 26 May 2021

Published online: 08 June 2021

References

- Maita S, Andersson B, Svensson JF, Wester T. Nonoperative treatment for nonperforated appendicitis in children: a systematic review and meta-analysis. *Ped Surg Int.* 2019;36(3):261–9.
- Andersson R, Hugander A, Thulin A, Nyström PO, Olaison G. Indications for operation in suspected appendicitis and incidence of perforation. *BMJ.* 1994;308(6921):107–10. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6921.107>.
- Young KA, Neuhaus NM, Fluck M, Blansfield JA, Hunsinger MA, Shabahang M, et al. Outcomes of complicated appendicitis: is conservative treatment as smooth as it seems? *Am J Surg.* 2018;215(4):586–92. <https://doi.org/10.1016/j.jamjsurg.2017.10.032>.
- Rubér M, Berg A, Ekerfelt C, Olaison G, Andersson RE. Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis. *Clin Exp Immunol.* 2006;143(1):117–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02957.x>.
- Rubér M, Andersson M, Petersson BF, Olaison G, Andersson RE, Ekerfeldt C. Systemic Th17-like cytokine pattern in gangrenous appendicitis but not in phlegmonous appendicitis. *Surgery.* 2010;147(3):366–72. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.09.039>.
- 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):504–9. <https://doi.org/10.1007/s12519-018-0173-3>.
- 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(3):335–40. <https://doi.org/10.1007/s00383-018-4423-1>.
- Gorter RR, Eker HH, Gorter-Stam MA. Diagnosis and management of acute appendicitis. EAES consensus development conference 2015. *Surg Endosc.* 2016;30(11):4668–90. <https://doi.org/10.1007/s00464-016-5245-7>.
- Carr NJ. The pathology of acute appendicitis. *Ann Diagn Pathol.* 2000;4(1):46–58. [https://doi.org/10.1016/S1092-9134\(00\)90011-X](https://doi.org/10.1016/S1092-9134(00)90011-X).
- Pogorelic Z, Luksic B, Nincevic S, Luksic B, Polasec O. Hyponatremia as a predictor of perforated acute appendicitis in pediatric population: a prospective study. *J Ped Surg.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2020.09.066>.
- Pogorelic Z, Mihanovic J, Nincevic S, Luksic B, Elezovic Beloevic S, Polasec O. Validity of appendicitis response score in distinguishing perforated from non-perforated appendicitis in children. *Children.* 2021. <https://doi.org/10.3390/children8040309>.
- Kiss N, Minderjahn MI, Reismann J, Svensson J, Wester T, Hauptmann K, Schad M, Kallarackal J, von Bernuth H, Reismann M. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes for pretherapeutic patient classification in acute appendicitis. *BJs open.* 2021. <https://doi.org/10.1093/bjsopen/zraa045>, 5, 1.
- 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(5):523–51. <https://doi.org/10.1111/acem.13181>.
- Rawolle T, Reismann M, Minderjahn MI, Bassir C, Hauptmann K, Rothe K, Reismann J. Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated appendicitis. *Br J Radiol.* 2019;92(1099):20190102. <https://doi.org/10.1259/bjr.20190102>.
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222030>, 14, 9, e0222030.
- Svensson JF, Patkova B, Almström M, Naji H, Hall NJ, Eaton S, et al. Nonoperative treatment with antibiotics versus surgery for acute nonperforated appendicitis in children: a pilot randomized controlled trial. *Ann Surg.* 2015;261(1):67–71. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000835>.
- Tang BMP, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RCY. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human Sepsis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2007;176(7):676–84. <https://doi.org/10.1164/rccm.200612-1819OC>.
- Donaldson JG, Jackson CL. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature Rev.* 2011;12(6):362–75.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Möglichkeit, unterschiedliche Formen der akuten Appendizitis im Kindes- und Jugendalter mittels etablierter und neuartiger Diagnostik zu unterscheiden. Hintergrund ist, dass in den letzten Jahrzehnten die Vorstellung von der akuten Appendizitis als progredientes Krankheitsbild von Forschern zunehmend in Frage gestellt wurde. Anhand der aktuellen Datenlage ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der klinisch als unkompliziert eingestuften, phlegmonösen, und der als komplizierte Erkrankung bezeichneten, gangränösen sowie perforierenden, Appendizitis um verschiedene Entitäten der akuten Appendizitis handelt. Sowohl epidemiologische als auch immunologische Studien weisen darauf hin, dass es Unterschiede zwischen den Formen der akuten Appendizitis gibt (3,5,6,18).

Im Rahmen der aktuellen COVID-19-Pandemie lassen sich die bereits bekannten epidemiologischen Erkenntnisse interessanterweise rekapitulieren. Die bereits beschriebene Beobachtung der epidemiologischen Unterschiede bei den appendizitischen Entitäten findet sich in verdichteter Form unter pandemischen Bedingungen. Eine frühe Erkenntnis während der Pandemie war, dass die Inzidenz der Appendizitis grundsätzlich gegenüber vergleichbaren vorpandemischen Zeiträumen altersunabhängig rückläufig war (83–88). Die anschließende Interpretation war uneinheitlich. So zeigte sich eine relative Erhöhung des Anteils mit komplizierter Appendizitis, wobei letztere auch hier nicht einheitlich definiert war. Diese Entwicklung wurde auf eine vermeintlich verzögerte Behandlung und Therapie der Appendizitis mit zwangsläufiger Entwicklung komplizierter Formen der Erkrankung geschoben (89–93). Insbesondere Multicenterstudien mit einem größeren Patientenkollektiv ergaben jedoch ein anderes Bild. Hier wurde darauf aufmerksam gemacht, dass es sich lediglich um einen relativen Anstieg der komplizierten Appendizitiden handelte, ohne dass sich hinsichtlich der absoluten Zahlen eine grundsätzliche Änderung feststellen ließ. Es wurde allerdings auch in absoluten Zahlen eine rückläufige Inzidenz der unkomplizierten Appendizitis über alle Altersgruppen hinweg gefunden, die sowohl den Rückgang der Inzidenz der Appendizitis im Allgemeinen und den relativen Anstieg der komplizierten Entzündung erklärt. Diese Beobachtung wurde wiederholt mit der bereits bekannten Tendenz zur Spontanremission der unkomplizierten Appendizitis erklärt (83,84,87,88).

Besonders interessant wird der Aspekt der unterschiedlichen Entitäten der akuten Appendizitis dadurch, dass die Machbarkeit von konservativen Therapiestrategien für die Behandlung der unkomplizierten Appendizitis gezeigt wurde (38–43). Die konservative Therapie könnte somit vielen Patient*innen mit akuter unkomplizierter Appendizitis eine operative Therapie ersparen. Eine konservative Therapie ist dabei nicht nur kostengünstiger, sondern auch die von Eltern und Kindern präferierte Behandlungsmethode (38).

Aus diesem Grund wird die Unterscheidung der verschiedenen Formen der akuten Appendizitis in der präoperativen Diagnostik zunehmend wichtiger werden. Die Ebene, auf der die Appendizitisformen unterschieden werden müssen, ist dabei essenziell. Im Gegensatz zu vielen Studien, die beim Vorliegen einer offensichtlich perforierenden Appendizitis von einer komplizierten Appendizitis ausgehen, wurde in den hier zusammengefassten Studien die komplizierte Erkrankung auf der histopathologischen Stufe der gangränösen Appendizitis, gekennzeichnet durch das Vorliegen einer wandübergreifenden Nekrose, definiert, auch wenn (noch) kein transmuraler Appendixwanddefekt vorlag. Grund hierfür ist, dass es bereits in diesem Stadium zur bakteriellen Migration durch die Appendixwand und dadurch zum Auftreten von vermehrten intraabdominellen und systemischen Komplikationen kommen kann (9,15,16).

Die ersten beiden Publikationen (**P1 und P2**) der hier vorliegenden Arbeit befassen sich mit der Labordiagnostik im Rahmen der akuten Appendizitis im Kindes- und Jugendalter (94,95). Es konnte aufgezeigt werden, dass das CRP, als allgemein inflammatorischer Parameter, bei Patient*innen mit akut komplizierter Appendizitis (ACA) bereits bei Symptombeginn signifikant höher liegt als bei Patient*innen mit akut unkomplizierter Appendizitis (AUA) und über die Zeiträume nach Symptombeginn kontinuierlich ansteigt. Bei Kindern mit AUA war das CRP im Zeitintervall >24-36 h nach Symptombeginn am höchsten und fiel dann wieder ab. Bei Betrachtung der Leukozyten konnte nachgewiesen werden, dass die Leukozyten bei Kindern mit ACA signifikant höher lagen als bei Kindern mit AUA. Bei Betrachtung der Subkompartimente war das Blutbild bei Patient*innen mit ACA von einer Erhöhung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten geprägt, wohingegen das Blutbild bei Patient*inne mit AUA eine Erhöhung der eosinophilen und basophilen Granulozyten aufwies.

Die Hochregulation von eosinophilen Granulozyten bei Kindern mit AUA ist über den Zeitraum nach Symptombeginn konstant.

Sollte es sich bei der akuten Appendizitis wie bisher angenommen um ein progredientes Krankheitsbild handeln, bei dem die phlegmonöse in die gangränöse Appendizitis übergeht, sollte man annehmen, dass sich die Subpopulationen der Leukozyten mit der Zeit in Anzahl und Relation verändern, was in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte. Somit spricht auch die Analyse des Blutbildes für unterschiedliche Entitäten der akuten Appendizitis. Des Weiteren konnte in den hier vorliegenden Arbeiten gezeigt werden, dass es bereits in den ersten 12 Stunden nach Symptombeginn zu Unterschieden im Blutbild von Patient*innen mit phlegmonöser oder gangränöser/perforierender Appendizitis kommt. Daher scheint die komplizierte Appendizitis schon vor Eintreffen im Krankenhaus vorzuliegen. Dies ist konklusiv mit der Diskussion in der Literatur, in der vielfach beschrieben ist, dass eine sofortige operative Therapie keinen Einfluss auf das Outcome der akuten Appendizitis hat (24–30).

Der pathophysiologische Hintergrund der Unterschiede in den Subpopulationen der Leukozyten bei Kinder mit AUA im Vergleich zu ACA ist vereinbar mit den Arbeiten von Rubér et al.. In diesen Arbeiten wurde beschrieben, dass es sich bei der phlegmonösen Appendizitis um einen Th2-abhängigen Mechanismus handelt. Im Gegensatz hierzu liegt bei der gangränösen und perforierenden Appendizitis ein Th1- und Th-17-abhängiger Mechanismus vor (5,6). Ein Th-2-abhängiger Mechanismus kann die Erhöhung der eosinophilen und basophilen Leukozyten bei Patient*innen mit AUA erklären (96). Ein Th-1- sowie Th-17-abhängiger Mechanismus ist vereinbar mit der Erhöhung der neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten bei Patient*innen mit komplizierter Appendizitis in den hier vorliegenden Arbeiten (5,97).

Interessanterweise konnten Rubér et al. nachweisen, dass sich nach Zellstimulation grundlegende immunologische Unterschiede im Zytokinmuster von Patient*innen mit unterschiedlichen Appendizitisentitäten auch noch Monate nach Erkrankung nachweisen lassen. Somit handelt es sich möglicherweise um einen konstitutiven Effekt (5). In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2000 wurden genetische Polymorphismen bei Patient*innen mit akuter Appendizitis untersucht. Hierbei fanden sich

mehrere Polymorphismen in inflammatorischen Genen von Patient*innen mit AUC und ACA, welche eine genetisch regulierte inflammatorische Reaktion nahelegt. Dies liefert zudem zusätzliches Verständnis zur Pathogenese der unkomplizierten akuten Appendizitis als möglicherweise selbstlimitierende Erkrankung (98).

Die Beobachtung der relativ erhöhten Eosinophilen bei Patient*innen mit phlegmonöser Appendizitis (Publikationen **P1** und **P2**) ist insbesondere mit Daten zu allergischen Ursachen für die Entstehung der phlegmonösen Appendizitis vereinbar (99). Allerdings konnte in der durchgeführten Genexpressionsanalyse keine verstärkte Expression von Pathways, die die eosinophilen Granulozyten involvieren, nachgewiesen werden (**P5**). Somit erscheint ein allergisches Geschehen weniger wahrscheinlich. Als alternative Erklärung für die Unterschiede der entsprechenden Zellzahlen spielen möglicherweise unterschiedliche Verteilung im Gewebe, veränderte Überlebenszeiten und die Induktion apoptotischer Prozesse eine Rolle (100).

Ein Kritikpunkt an beiden ersten Studien ist das retrospektive Studiendesign. Vor allem die Einteilung in Zeitintervalle nach Symptombeginn stellt eine Herausforderung im Rahmen einer retrospektiven Studie dar. Um eine zuverlässige Zuteilung zu zeitlichen Einheiten zu ermöglichen, wurden mehrstündige Zeitintervalle nach Symptombeginn definiert. Des Weiteren wurden lediglich Patient*innen eingeschlossen, bei denen eine sichere Zuordnung zu den einzelnen Zeitintervallen möglich war. Eine Stärke der vorliegenden Arbeiten war die sehr hohe Anzahl an eingeschlossenen Patient*innen von 647 (**P1**) und 1041 (**P2**) Kindern im Alter zwischen 0-17 Jahren.

Neben der Laboranalyse hat die Ultraschalluntersuchung als bildgebendes Verfahren einen hohen Stellenwert in der Diagnostik einer akuten Appendizitis. Es handelt sich hierbei um eine strahlenfreie und leicht durchführbare Bildgebung, sodass sie im Kindes- und Jugendalter den Goldstandard darstellt (Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Radiologie 2020). In der hier durchgeführten Studie wurde die Ultraschalldiagnostik durch Kinderradiologen bei der akuten Appendizitis (**P3**) ausgewertet. Es wurde gezeigt, dass sich mehrere Parameter zur Unterscheidung einer unkomplizierten von einer komplizierten Appendizitis eignen:

Appendixdurchmesser, periappendizitische Fettinflammation und das Vorhandensein eines Appendikolithen sowie die durch den Kinderradiologen vermutete Perforation (101).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass ein Appendixdurchmesser von über 6 mm die höchste Sensitivität (98%) zur Erkennung einer akuten Appendizitis aufwies. Allerdings war die Spezifität gering (11%). Zudem rangierte der Appendixdurchmesser bei Patient*innen mit Negativappendektomie zwischen 2-13 mm, sodass deutlich wird, dass der Appendixdurchmesser nicht als alleiniger Marker zur Diagnostik einer akuten Appendizitis gewertet werden kann. Dennoch wird auch ein Appendixdurchmesser von 6 mm als Cutoff-Wert zur Diagnostik einer akuten Appendizitis in der Literatur angegeben (81).

In Bezug auf die periappendizitische Fettinflammation konnte unsere Arbeit erstmalig eine signifikante Assoziation mit der komplizierten Appendizitis nachweisen. Bisherige Studien konnten hier bisher nur eine positive Assoziation ohne Nachweis einer Signifikanz andeuten (55,56). Der Grund hierfür könnte in der deutlich größeren Patientenzahl von 446 Kindern mit AUA und 348 Kindern mit ACA der hier vorliegenden Studie begründet sein. Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten wurde in unserer Arbeit auch die gangränöse Appendizitis (auch ohne Perforation) zur klinisch komplizierten Appendizitis gezählt, was zu einem signifikanten Unterschied der Gruppen AUA vs. ACA geführt haben könnte.

Das Vorhandensein eines Appendikolithen als Zeichen einer akuten Appendizitis wird in der Literatur kontrovers diskutiert (11,56,57). In der vorliegenden Arbeit war das Vorhandensein eines Appendikolithen ein hoch spezifisches radiologisches Zeichen für das Vorhandensein einer komplizierten Appendizitis (Spezifität von 90%). Zudem lag in der untersuchten Studienpopulation ein Appendikolith gehäuft bei jüngeren Kindern vor, bei denen ebenfalls die komplizierte Form der akuten Appendizitis vermehrt vorlag.

Die höchste Spezifität von 94% zur Festlegung einer komplizierten Appendizitis erreichte die vermutete Perforation durch den Kinderradiologen. Bei diesem Aspekt spielt wahrscheinlich die große Erfahrung der hiesigen Kinderradiologen eine Rolle. Hierbei handelte es sich in Rücksprache mit unseren Kinderradiologen am ehesten um eine Beurteilung der Gesamtzusammenschau des sonographischen Befundes durch den erfahrenen Sonographeur.

Insgesamt ergeben sich allerdings in Bezug auf Sensitivitäten und Spezifitäten der untersuchten Parameter teils deutliche Unterschiede, so dass sich die einzelnen Parameter möglicherweise am besten in Kombination diagnostisch nutzen lassen.

Die Besonderheit der Studie ist, dass es sich um eine der ersten Arbeiten mit dem sonographischen Hinweis auf histologische Entitäten der akuten Appendizitis handelt. Diese Arbeit wurde in den nachfolgenden Jahren zahlreich zitiert (102–108). Einige sonographische Parameter haben eine hohe Sensitivität oder Spezifität hinsichtlich der Differenzierung einer komplizierten gangränösen von einer unkomplizierten phlegmonösen Appendizitis. Ebenso wie bei den vorherigen Arbeiten (**P1** und **P2**) war eine entscheidende Limitation dieser Studie das retrospektive Studiendesign. Dies könnte zu unvollständigen sonographischen Befunden geführt haben. Die zugrunde liegenden Parameter waren zudem nicht standardisiert. Eine Stärke der Studie **P3** war erneut die hohe Patientenzahl von über 1000 eingeschlossenen Kindern mit akuter Appendizitis. Zudem wurden die Ultraschalluntersuchungen nur durch Fachärzt*innen für Kinderradiologie durchgeführt, sodass eine hohe fachliche Kompetenz der Untersucher vorlag.

Eine Herausforderung ist die Übertragbarkeit der hier dargestellten Methoden auf den klinischen Alltag einer pädiatrischen Notaufnahme. In der Analyse des Differentialblutbildes können bestimmte Werte für das Vorliegen einer unkomplizierten oder komplizierten Appendizitis sprechen. Auch in der Abdomensonographie ist eine präoperative Differenzierung der Appendizitisentitäten anhand bestimmter Befunde möglich. Allerdings liefern weder Blutbild noch Sonographie eine ausreichende diagnostische Sicherheit, um die präoperative Unterscheidung einer unkomplizierten von der komplizierten Appendizitis eindeutig zu ermöglichen. Insbesondere die progrediente Entwicklung der Parameter während des inflammatorischen Prozesses macht eine Definition zeitunabhängiger Schwellenwerte unmöglich. Hinzu kommt, dass die begrenzte Anzahl der in der Routine zur Verfügung stehenden Werte auch nur eine begrenzte Differenzierbarkeit zulassen. Ein Ziel in der vorliegenden Arbeit war es daher, die Anzahl der zur Verfügung stehenden Parameter deutlich zu erhöhen.

Die Genexpressionsanalyse spiegelt die pathophysiologischen Vorgänge auf früher Ebene dynamisch wider. Somit bietet sie sich nicht nur durch die extrem große Anzahl der Datensätze an, sondern bietet auch den Vorteil einer sehr guten zeitlichen Auflösung.

Die Genexpressionsanalyse ermöglicht zum einen Einblicke in die Pathophysiologie des noch unzureichend verstandenen Krankheitsbildes der akuten Appendizitis. Zum anderen kann die Anwendung einer Genexpressionsanalyse kombiniert mit modernen Methoden der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens einen neuen klinisch-diagnostischen Ansatz zur Differenzierung der Appendizitiden bei Kindern und Jugendlichen mit akuter Appendizitis darstellen. In weiteren Arbeiten (**P4-P6**) erfolgte daher die Anwendung von Methoden der künstlichen Intelligenz auf Genexpressionsdaten von Patient*innen mit akuter Appendizitis.

Künstliche Intelligenz (KI) und maschinelles Lernen (ML) sind in der Lage, den Informationsgehalt vorliegender Daten auf der Basis mathematischer Modelle deutlich zu erhöhen. Die Methoden werden zunehmend in der Diagnostik innerhalb der Medizin angewandt. In der hier durchgeführten Studie (**P4**) wurden Methoden der künstlichen Intelligenz auf Untersucher-unabhängige Parameter (Blutbild, C-reaktives Protein, Appendixdurchmesser im Ultraschall) von 590 Patient*innen angewandt. Von allen Ultraschallbefunden handelt es sich beim Appendixdurchmesser um einen geeigneten Parameter zur Diagnostik einer Appendizitis, welcher weitestgehend unabhängig von Interpretation sowie unabhängig vom Alter der Patient*innen ist (109). Es konnte bestätigt werden, dass Methoden der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens die Vorhersagegenauigkeit einer Appendizitis im Vergleich zur bisherigen Diagnostik erhöhen können (110). Um eine methodische Schwäche zu vermeiden, wurden 35% der Daten zum Training der Methode verwendet und die verbleibenden 65% der Daten für die Validierung des Modells verwendet. Ziel unseres Vorgehens war in den betreffenden Studien die Definition einer sog. Biomarkersignatur. Dabei handelt es sich um die kleinstmögliche Kombination von Parametern mit der bestmöglichen Vorhersageleistung. Allein durch eine Biomarkersignatur auf der Basis von konventionellen Laborparametern kann mittels Methoden der KI eine Sensitivität von 95% erreicht werden. Durch Verwendung des Appendixdurchmessers sowie den Subpopulationen der Leukozyten in unserer Studie konnte

eine Genauigkeit (engl. Accuracy) von 90% für die Validierungsdaten erreicht werden. Dies könnte zwei von drei Patient*innen die Appendektomie ersparen.

Im Jahr 2020 erschienen zwei weitere Arbeiten, die sich mit KI bei der Diagnostik der kindlichen Appendizitis befassen. Akmese et al. entwickelten eine Schätzmethode basierend auf ML, um Patienten mit akuter Appendizitis zu identifizieren. Sie konnten zeigen, dass der Algorithmus mit Gradient-Boost-Trees den besten Erfolg erzielen konnte (111). In der Arbeit von Aydin et al. konnte mit Hilfe des maschinellen Lernens eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 97% zur Erkennung einer akuten Appendizitis erreicht werden (112). Dies bestätigt, dass Methoden der künstlichen Intelligenz in der Chirurgie anwendbar sind, was auch durch ein Review zum maschinellen Lernen zur Entscheidungsfindung in der abdominalen Chirurgie bekräftigt wird (113).

Unsere Studie zur künstlichen Intelligenz in der Diagnostik der akuten Appendizitis (**P4**) fand Eingang in zahlreiche weitere Arbeiten. Dazu gehören eine Reihe von Studien, die sich mit der KI auf anderen Gebieten der Chirurgie befassen, u. a. bei der biliären Atresie (114), im Rahmen der Sepsis (115), bei Komplikationen der perkutanen endoskopischen Gastrostomie (116) und im Rahmen von abdominalen Notfällen in der Erwachsenen Chirurgie (117). Eine Arbeit zum maschinellen Lernen in der Diagnostik, dem Management und zur Einteilung der akuten Appendizitis veröffentlichten Marcinkevics et al.. In dieser Arbeit wurden die Anamnese, klinische Untersuchungsbefunde, Laborparameter und Ultraschallbefunde von 430 Kindern mittels Klassifikations- und Regressionsverfahren analysiert. Das Modell erzielte ein sehr gutes Ergebnis zur Diagnosefindung der akuten Appendizitis. Auch diese Arbeitsgruppe diskutierte, dass das Ziel weiterer Untersuchungen die Erweiterung der Anwendung von Methoden des maschinellen Lernens zur Diagnosestellung von Kindern mit abdominalen Schmerzen sein sollte und dass dies ein wertvolles Instrument zur Diagnosestellung einer akuten Appendizitis werden könnte (118). Die Differenzierung der hier besprochenen Appendizitidentitäten stellt jedoch anscheinend weiter eine besondere Herausforderung dar.

Eine Limitation der ersten Arbeiten (**P1-P4**) war das retrospektive Studiendesign. In der darauffolgenden prospektiven Arbeit (**P5**) wurde bei Patienten mit phlegmonöser und gangränöser Appendizitis eine genomweite Genexpressionsanalyse durchgeführt. Ziel war

zum einen pathophysiologisches Verständnis der Appendizitis zu erlangen, zum anderen Kandidatengene zur Differenzierung der Appendizitidentitäten zu ermitteln.

In der vorliegenden Studienpopulation wurden über 6% der Gene von Kindern mit AUA und ACA statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert, was für eindeutige Unterschiede im immunologischen Geschehen der Appendizitidentitäten spricht. Anhand der genomweiten Genexpressionsanalyse konnte die Hypothese unterstützt werden, dass es bei der phlegmonösen Appendizitis zur Aktivierung antiviraler Mechanismen und bei der gangränösen Appendizitis zur Aktivierung antibakterieller Mechanismen kommt (119). So zeigte sich bei Patient*innen mit phlegmonöser Appendizitis insbesondere eine signifikante Überexpression zahlreicher alpha- und beta-Untereinheiten von T-Zell-Rezeptoren. Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor beschriebene These Th2-Helferzell-abhängiger Mechanismen bei Patienten mit phlegmonöser Appendizitis (5,6). Eine zentrale Beobachtung unserer Arbeit war die Überexpression von Elementen einer immunologischen Synapse zwischen T- und B-Zellen bei den Patient*innen mit phlegmonöser Appendizitis, die typisch für eine antivirale Abwehr ist, neben den genannten T-Zell-Rezeptoruntereinheiten: CD2, CD3, MHC II, CD40L (120,121). Interessanterweise wurde in einer unabhängigen Studie beschrieben, dass die Bestimmung von CD40L im Serum zur Diagnose der akuten Appendizitis im Kindesalter genutzt werden kann. Eine Unterscheidung einer unkomplizierten und komplizierten Appendizitis ist demnach vor allem in den ersten Tagen nach Symptombeginn möglich (122).

Bei Patient*innen mit gangränöser Appendizitis fand sich in der vorliegenden Studie unter anderem eine Erhöhung von IL-17A. Dies ist vereinbar mit der Beschreibung, dass der IL-17A rs2275913 Polymorphismus für eine fortgeschrittene Inflammation im Rahmen einer Appendizitis assoziiert ist (98).

Die Stärken der vorliegenden Studie (**P5**) liegen im prospektiven Studiendesign und in der Art der Datenanalyse. Zudem wurden histopathologische Befunde erneut durch Fachärzt*innen für Pathologie ausgewertet und somit eine hohe Sicherheit der richtigen Patientenzuordnung in die unterschiedlichen Gruppen gesichert. Durch eine erhöhte Fallzahl hätte die Auswertung höchstwahrscheinlich eine noch bessere Aussagekraft über immunologische Unterschiede zwischen AUA und ACA ergeben.

In der folgenden Proof-of-Concept-Studie (**P6**) wurden erstmals Methoden der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens auf Genexpressionsdaten zur Unterscheidung der Appendizitisentitäten angewendet. Hierfür wurden die zuvor untersuchten 56666 Gene von 13 Patient*innen mit phlegmonöser und 16 Patient*innen mit gangränöser Appendizitis analysiert (123). Ein Set von 4 Genen hat sich als die geeignetste Biomarkersignatur zur Diskriminierung einer phlegmonösen von einer gangränösen Appendizitis durchgesetzt. Hierdurch konnte die Vorhersagegenauigkeit im Vergleich zu den zuvor von uns beschriebenen Methoden im experimentellen Setting theoretisch weiter erhöht werden. Es gibt bisher keine weitere Studie, bei der Methoden der künstlichen Intelligenz auf Genexpressionsdaten von Appendizitispatient*innen angewendet wurden. Im immunologischen/infektiologischen Bereich ist dies bisher nur sehr begrenzt für andere Krankheiten, wie z.B. die Sepsis, untersucht worden. Hier konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Anwendung von Methoden der KI auf Genexpressionsdaten möglich und sinnvoll ist (124).

Bei den 4 Genen, die die beste Biomarkersignatur entwickeln, handelt es sich um: *ERGIC and golgi 3*, *regulator of G-protein signaling 2*, *Rho GTPase activating protein 33* und *Golgi Reassembly Stacking Protein 2*. Die Genprodukte dieser Gene sind in Zellfunktionen, welche die Bildung des Zytoskeletts, die GTP Bindung, den Membranverkehr und die zellulären Signalwege involviert (125). Von den hier beschriebenen Genen, waren *ERGIC and golgi 3* allein nicht signifikant. Die Anwendung von künstlicher Intelligenz ergibt hier im Vergleich zur Anwendung von Standardverfahren der statistischen Auswertung einen zusätzlichen Benefit. Dies beweist, dass die Anwendung von Verfahren der künstlichen Intelligenz und des maschinellen Lernens die diagnostischen Möglichkeiten erweitern kann.

Trotz jahrhundertelanger Forschung ist die zuverlässige Diagnose der akuten Appendizitis immer noch eine Herausforderung. Die Geschichte der Diagnostik und Behandlung der Appendizitis ist eine Geschichte der menschlichen Wahrnehmung mit all ihren Limitationen und Irrtümern. Ein erstes Ziel der vorliegenden Habilitationsschrift ist zunächst eine sinnvolle Klassifizierung der akuten Appendizitis im Kindes- und Jugendalter auf der Basis objektiver Parameter. Insbesondere die genomweite Genexpressionsanalyse bei Patient*innen mit phlegmonöser und gangränöser Appendizitis erscheint konklusiv in einer Reihe aktueller

immunologischer Studien. Ein weiteres zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diese neuen pathophysiologischen Erkenntnisse hinsichtlich ihrer Eignung zur Erweiterung und Präzisierung der zur Verfügung stehenden Diagnostik zu untersuchen. Dies hat insbesondere für neue konservative Therapiestrategien eine Bedeutung, die bisher für die routinemäßige Anwendung eine zu hohe Versagensquote aufweisen. Neben sinnvoller Differenzierungskriterien spielt hier die Vergrößerung der zur Differenzierung verwendbaren Datenmenge und die Verbesserung der Datenqualität eine zentrale Rolle. Auf der Basis dieser Grundvoraussetzungen kann nun die künstliche Intelligenz leisten, was sie am besten kann: erkennen, wo die menschliche Wahrnehmung versagt.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Hintergrund der hier zusammengefassten Studien war die aktuelle Datenlage, die dafür spricht, dass es sich bei der klinisch unkomplizierten, histopathologisch phlegmonösen und der klinisch komplizierten, histopathologisch gangränösen Appendizitis um unabhängige Entitäten handelt. Diese können unterschiedlichen Therapieoptionen (konservativ vs. operativ) zugeführt werden. Vor diesem Hintergrund war es ein Ziel der Arbeiten zu untersuchen, wie die Formen der akuten Appendizitis im Kindes- und Jugendalter bereits prätherapeutisch unterschieden werden können.

Sowohl in der Labordiagnostik (**P1** und **P2**) als auch im Ultraschall (**P3**) lassen sich Unterschiede zwischen Patient*innen mit unkomplizierter, phlegmonöser und komplizierter (gangränöser und perforierender) Appendizitis aufzeigen. Hierdurch allein kann allerdings aufgrund unzureichender Trennschärfe noch keine ausreichende Entscheidungssicherheit erreicht werden. Mit Verfahren der künstlichen Intelligenz auf Untersucher-unabhängige diagnostische Parameter (**P4**) konnte die Vorhersagegenauigkeit der akuten Appendizitis weiter gesteigert werden. Interessante Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen Pathomechanismen der beiden inflammatorischen Entitäten ergaben sich durch eine differenzielle Genexpressionsanalyse (**P5**). In einer Proof-of-Concept-Studie wurden zuvor beschriebene Methoden der künstlichen Intelligenz auf die Genexpressionsdaten angewandt (**P6**). Hierdurch konnte im Modell eine grundsätzliche Differenzierbarkeit der Entitäten durch die Anwendung der neuen Methode aufgezeigt werden.

Ein mittelfristiges Ziel ist es, eine Biomarkersignatur zu definieren, die ihre Aussagekraft durch einen Computeralgorithmus hat. Hierdurch soll eine schnelle Therapieentscheidung ermöglicht werden. Im Idealfall sollte diese Biomarkersignatur sicher, objektiv und einfach zu bestimmen sein sowie eine höhere diagnostische Sicherheit als die bisherige Diagnostik mittels Anamnese, Untersuchung, Laboranalyse und Ultraschall bieten.

Langfristiges Ziel von Folgestudien ist die Identifizierung einer Biomarkersignatur mit der bestmöglichen Vorhersagekraft. Hinsichtlich der routinemäßigen klinischen Diagnostik ist die Anwendung von Point-of-Care Devices auf PCR-Basis denkbar. Hier könnte eine limitierte

Anzahl von Primern für eine Biomarkersignatur mit hoher Vorhersagekraft zum Einsatz kommen. Der dadurch ermittelte Biomarker würde seine Aussagekraft durch einen einfach anzuwendenden Computeralgorithmus erhalten. Die Kombination aus Genexpressionsanalyse mit Methoden der künstlichen Intelligenz kann somit die Grundlage für ein neues diagnostisches Instrument zur sicheren Unterscheidung unterschiedlicher Appendizitisentitäten darstellen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. DeFrances CJ, Golosinskiy A, Hall MJ, Schwartzmann A, Williams SN. National Hospital Discharge Survey: 2007 Summary. 2010;(29):1-20. Available from: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/5809>
2. Addiss DG, Shaffer N, Fowler BS, v Tauxe R. The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the United States. *Am J Epidemiol.* 1990;132(5):910-25. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115734>
3. Andersson R, Hugander A, Thulin A, Nystrom PO, Olaison G. Indications for operation in suspected appendicitis and incidence of perforation. *BMJ.* 1994;308:107. Doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6921.107>
4. Lamps LW. Infectious Causes of Appendicitis. *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24(4):995-1018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.07.012>
5. Rubér M, Berg A, Ekerfelt C, Olaison G, Andersson RE. Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis. *Clin Exp Immunol.* 2006;143(1):117–24. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02957.x>
6. Rubér M, Andersson M, Petersson BF, Olaison G, Andersson RE, Ekerfelt C. Systemic Th17-like cytokine pattern in gangrenous appendicitis but not in phlegmonous appendicitis. *Surgery.* 2010;147(3):366–72. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.09.039>
7. Lamps LW. Appendicitis and infections of the appendix. *Semin Diagn Pathol.* 2004;21(2):86-79. Doi: <https://doi.org/10.1053/j.sem dp.2004.11.003>
8. Bhangu A, Søreide K, Di Saverio S, Hansson J, Assarsson JH, Drake FT. Acute appendicitis: modern understanding of pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet.* 2015;386(10000):1278-87. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00275-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00275-5)
9. Carr NJ. The pathology of acute appendicitis. *Ann Diagn Pathol.* 2000;4(1):46-58. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1092-9134\(00\)90011-X](https://doi.org/10.1016/S1092-9134(00)90011-X)
10. Chang AR. An analysis of the pathology of 3003 appendices. *ANZ J Surg.* 1981;51(2):169-78. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1981.tb05932.x>
11. Andreou P, Blain S, Du Boulay CEH. A histopathological study of the appendix at autopsy and after surgical resection. *Histopathol.* 1990;17(5):427-31. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1990.tb00763.x>

12. Gauderer MWL, Crane MM, Green JA, DeCou JM, Abrams RS. Acute appendicitis in children: The importance of family history. *J Pediatr Surg.* 2001;36(8): 1214-17. Doi: <https://doi.org/10.1053/jpsu.2001.25765>
13. Basta M, Morton NE, Mulvihill JJ, Radovanovic Z, Radojicic C, Marinkovic D. Inheritance of acute appendicitis: familial aggregation and evidence of polygenic transmission. *Am J Hum Genet.* 1990;46(2):377–82.
14. Graffeo CS, Counselman FL. Appendicitis. *Emerg Med Clin North Am.* 1996 Nov;14(4):653-671. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0733-8627\(05\)70273-X](https://doi.org/10.1016/S0733-8627(05)70273-X)
15. 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(5):517-20. Doi: <https://doi.org/10.1089/sur.2013.106>
16. Imaoka Y, Itamoto T, Takakura Y, Suzuki T, Ikeda S, Urushihara T. Validity of predictive factors of acute complicated appendicitis. *World J Emerg Surg.* 2016;11:48. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13017-016-0107-0>
17. Omling E, Salö M, Saluja S, Bergbrant S, Olsson L, Persson A, Björk J, Hagander L. Nationwide study of appendicitis in children. *Br J Surg.* 2019;106(12):1623-1631. Doi: <https://doi.org/10.1002/bjs.11298>
18. Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC, Lindberg GM, Jialal I, Munford RS, O’Keefe GE. Innate Immunity Genes Influence the Severity of Acute Appendicitis. *Ann Surg.* 2004;240(2):269-77. Doi: [10.1097/01.sla.0000133184.10676.26](https://doi.org/10.1097/01.sla.0000133184.10676.26)
19. Hall NJ, Eaton S, Abbo O, Arnaud AP, Beaudin M, Brindle M, Bütter A, Davies D, Jancelewicz T, Johnson K, Keijzer R, Lapidus-Krol E, Offringa M, Piché N, Rintala R, Skarsgard E, Svensson JF, Ungar WJ, Wester T, Willan AR, Zani A, St Peter SD, Pierro A. 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;1(1):bmjpo-2017-000028. Doi: [10.1136/bmjpo-2017-000028](https://doi.org/10.1136/bmjpo-2017-000028)
20. McBurney C. The incision made in the abdominal wall in cases of appendicitis, with a description of a new method of operating. *Ann Surg.* 1894;20(1):38-43. Doi: [10.1097/00000658-189407000-00004](https://doi.org/10.1097/00000658-189407000-00004)

21. Jaschinski T, Mosch CG, Eikermann M, Neugebauer EAM, Sauerland S. Laparoscopic versus open surgery for suspected appendicitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001546.pub4>
22. Semm K. Endoscopic Appendectomy. *Endoscopy*. 1983;15(2):59-64. Doi: 10.1055/s-2007-1021466
23. Yardeni D, Hirschl RB, Drongowski RA, Teitelbaum DH, Geiger JD, Coran AG. Delayed versus immediate surgery in acute appendicitis: do we need to operate during the night? *J Ped Surg*. 2004 Mar;39(3):464-469. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2003.11.020>
24. Taylor M, Emil S, Nguyen N, Ndiforchu F. Emergent vs urgent appendectomy in children: a study of outcomes. *J Ped Surg*. 2005;40(12):1912-1915. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2005.08.005>
25. Clyde C, Bax T, Merg A, MacFarlane M, Lin P, Beyersdorf S, McNevin MS. Timing of intervention does not affect outcome in acute appendicitis in a large community practice. *Am J Surg*. 2008;195(5):590-93. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2008.01.005>
26. Burjonrappa S, Rachel D. Pediatric appendectomy: optimal surgical timing and risk assessment. *Am Surg*. 2014;80(5):496–9. Doi: <https://doi.org/10.1177/000313481408000522>
27. Hornby ST, Shahtahmassebi G, Lynch S, Ladwa N, Stell DA. Delay to surgery does not influence the pathological outcome of acute appendicitis. *Scand J Surg*. 2014;103(1):5-11. Doi: 10.1177/1457496913495474
28. Gurien LA, Wyrick DL, Smith SD, Dassinger MS. Optimal timing of appendectomy in the pediatric population. *J Surg Res*. 2016;202(1):126-131. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.12.045>
29. Almström M, Svensson JF, Patkova B, Svenningsson A, Wester T. In-hospital Surgical Delay Does Not Increase the Risk for Perforated Appendicitis in Children. *Ann Surg*. 2017;265(3):616-621. Doi: <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001694>
30. Litz CN, Asuncion JB, Danielson PD, Chandler NM. Timing of antimicrobial prophylaxis and infectious complications in pediatric patients undergoing appendectomy. *Journal of Pediatric Surgery*. 2018;53(3):449-451. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.05.005>

31. Song DW, Park BK, Suh SW, Lee SE, Kim JW, Park J-M, Kim HR, Lee M-K, Choi YS, Kim BG, Park YG. Bacterial culture and antibiotic susceptibility in patients with acute appendicitis. *Int J Colorectal Dis.* 2018;33(4):441-7. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00384-018-2992-z>
32. Lee SL, Islam S, Cassidy LD, Abdullah F, Arca MJ. Antibiotics and appendicitis in the pediatric population: an American Pediatric Surgical Association Outcomes and Clinical Trials Committee Systematic Review. *J Ped Surg.* 2010;45(11):2181-5. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2010.06.038>
33. Maltezou H, Nikolaidis P, Lebesii E, Dimitriou L, Androulakakis E, Kafetzis D. Piperacillin/Tazobactam Versus Cefotaxime Plus Metronidazole for Treatment of Children with Intra-Abdominal Infections Requiring Surgery. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20(9):643-6. Doi: <https://doi.org/10.1007/s100960100581>
34. Simillis C, Symeonides P, Shorthouse AJ, Tekkis PP. A meta-analysis comparing conservative treatment versus acute appendectomy for complicated appendicitis (abscess or phlegmon). *Surgery.* 2010;147(6):818-29. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.11.013>
35. Andersson RE, Petzold MG. Nonsurgical Treatment of Appendiceal Abscess or Phlegmon. *Ann Surg.* 2007;246(5):741-748. Doi: [10.1097/SLA.0b013e31811f3f9f](https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31811f3f9f)
36. Weber TR, Keller MA, Bower RJ, Spinner G, Vierling K. Is delayed operative treatment worth the trouble with perforated appendicitis in children? *Am J Surg.* 2003;186(6):685-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2003.08.027>
37. Hartwich J, Luks FIG, Muratore CS, Wills HE, Tracy TF. Nonoperative treatment of acute appendicitis in children: A feasibility study. *J Ped Surg.* 2016;51(1):111-6. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.024>
38. Styruud J, Eriksson S, Nilsson I, Ahlberg G, Haapaniemi S, Neovius G, Rex L, Badume I, Granström L. Appendectomy versus Antibiotic Treatment in Acute Appendicitis. A Prospective Multicenter Randomized Controlled Trial. *World J Surg.* 2006;30(6):1033-7. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00268-005-0304-6>
39. Eriksson S, Granström L. Randomized controlled trial of appendectomy *versus* antibiotic therapy for acute appendicitis. *Br J Surg.* 1995;82(2):166-9. Doi: [10.1002/bjs.1800820207](https://doi.org/10.1002/bjs.1800820207).

40. Hansson J, Körner U, Khorram-Manesh A, Solberg A, Lundholm K. Randomized clinical trial of antibiotic therapy *versus* appendectomy as primary treatment of acute appendicitis in unselected patients. *British Journal of Surgery*. 2009;96(5):473-81. Doi: 10.1002/bjs.6482
41. Svensson J, Patkova B, Almström M, Naji H, Hall NJ, Eaton S, Pierro A, Wester T. Nonoperative treatment with antibiotics versus surgery for acute nonperforated appendicitis in children: a pilot randomized controlled trial. *An Surg*. 2015;261(1):67–71. Doi: 10.1097/SLA.0000000000000835
42. Patkova B, Svenningsson A, Almström M, Eaton S, Wester T, Svensson JF. Nonoperative Treatment Versus Appendectomy for Acute Nonperforated Appendicitis in Children: Five-year Follow up of a Randomized Controlled Pilot Trial. *Ann Surg*. 2020;271(6):1030-5. Doi: 10.1097/SLA.0000000000003646
43. Di Saverio S, Podda M, De Simone B, Ceresoli M, Augustin G, Gori A, et al. Diagnosis and treatment of acute appendicitis: 2020 update of the WSES Jerusalem guidelines. *World J Emerg Surg*. 2020;15(1):27. Doi: 10.1186/s13017-020-00306-3
44. 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(5):523-551. Doi: 10.1111/acem.13181
45. 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(1):95-104. Doi: 10.1016/j.jclinepi.2012.09.004
46. Andersson M, Rubér M, Ekerfelt C, Hallgren HB, Olaison G, Andersson RE. Can New Inflammatory Markers Improve the Diagnosis of Acute Appendicitis? *World J Surg*. 2014;38(11):2777-83. Doi: 10.1007/s00268-014-2708-7
47. Bates MF, Khandar A, Steigman SA, Tracy TF, Luks FI. Use of White Blood Cell Count and Negative Appendectomy Rate. *Pediatrics*. 2014;133(1):e39-44. Doi: 10.1542/peds.2013-2418
48. Kahramanca S, Ozgehan G, Seker D, Gokce EI, Seker G, Tunc G, Küçükpinar T, Kargici H. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of acute appendicitis. *Turkish J Trauma Emerg Surg*. 2014;20(1):19-22. Doi: 10.5505/tjtes.2014.20688

49. Yang J, Liu C, He Y, Cai Z. Laboratory Markers in the Prediction of Acute Perforated Appendicitis in Children. *Emerg Med Int.* 2019;2019:4608053. Doi: 10.1155/2019/4608053
50. Hajibandeh S, Hajibandeh S, Hobbs N, Mansour M. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts acute appendicitis and distinguishes between complicated and uncomplicated appendicitis: A systematic review and meta-analysis. *Am J Surg.* 2020;219(1):154-163. Doi: 10.1016/j.amjsurg.2019.04.018
51. Kim MS, Park HW, Park JY, Park H-J, Lee S-Y, Hong HP, Kwag HJ, Kwon H-J. Differentiation of early perforated from nonperforated appendicitis: MDCT findings, MDCT diagnostic performance, and clinical outcome. *Abdom Imaging.* 2014;39(3):459-66. Doi: 10.1007/s00261-014-0117-x
52. Rosenbaum DG, Askin G, Beneck DM, Kovanlikaya A. Differentiating perforated from non-perforated appendicitis on contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Pediatr Radiol.* 2017;47(11):1483-90. Doi: 10.1007/s00247-017-3900-3
53. Kessler N, Cyteval C, Gallix B, Lesnik A, Blayac P-M, Pujol J, Bruel J-M, Taourel P. Appendicitis: Evaluation of Sensitivity, Specificity, and Predictive Values of US, Doppler US, and Laboratory Findings. *Radiology.* 2004;230(2):472-8. Doi: 10.1148/radiol.2302021520
54. Goldin AB, Khanna P, Thapa M, McBroom JA, Garrison MM, Parisi MT. Revised ultrasound criteria for appendicitis in children improve diagnostic accuracy. *Pediatr Radiol.* 2011;41(8):993-9. Doi: 10.1007/s00247-011-2018-2
55. Carpenter JL, Orth RC, Zhang W, Lopez ME, Mangona KL, Guillerman RP. Diagnostic Performance of US for Differentiating Perforated from Nonperforated Pediatric Appendicitis: A Prospective Cohort Study. *Radiology.* 2017;282(3):835-41. Doi: 10.1148/radiol.2016160175
56. Blumfield E, Nayak G, Srinivasan R, Muranaka MT, Blitman NM, Blumfield A, Levin TL. Ultrasound for differentiation between perforated and nonperforated appendicitis in pediatric patients. *Am J Roentgenol.* 2013;200(5):957-62. Doi: 10.2214/AJR.12.9801
57. Tulin-Silver S, Babb J, Pinkney L, Strubel N, Lala S, Milla SS, Tomita S, Fefferman NR. The challenging ultrasound diagnosis of perforated appendicitis in children: constellations of sonographic findings improve specificity. *Pediatr Radiol.* 2015;45(6):820-30. Doi: 10.1007/s00247-014-3232-5

58. Blumfield E, Yang D, Grossman J. Scoring system for differentiating perforated and non-perforated pediatric appendicitis. *Emerg Radiol.* 2017;24(5):547-54. Doi: 10.1007/s10140-017-1535-1
59. Xu Y, Jeffrey RB, Chang ST, DiMaio MA, Olcott EW. Sonographic Differentiation of Complicated From Uncomplicated Appendicitis: Implications for Antibiotics-First Therapy. *J Ultrasound Med.* 2017 Feb;36(2):269-77. Doi: 10.7863/ultra.16.03109
60. Försch S, Klauschen F, Hufnagl P, Roth W. Artificial intelligence in pathology. *Dtsch Arztebl Int.* 2021;118(12):194-204. Doi: 10.3238/arztebl.m2021.0011
61. Sathya R, Abraham A. Comparison of supervised and unsupervised learning algorithms for pattern classification. *IJARAI.* 2013;(2):34–8.
62. Park SH, Kressel HY. Connecting Technological Innovation in Artificial Intelligence to Real-world Medical Practice through Rigorous Clinical Validation: What Peer-reviewed Medical Journals Could Do. *J Korean Med Sci.* 2018;33(22):e152. Doi: 10.3346/jkms.2018.33.e152
63. Payrovnaziri SN, Chen Z, Rengifo-Moreno P, Miller T, Bian J, Chen JH, Liu X, He Z. Explainable artificial intelligence models using real-world electronic health record data: a systematic scoping review. *J Am Med Inform Assoc.* 2020;27(7):1173–85. Doi: 10.1093/jamia/ocaa053
64. Nicholson C. A Beginner’s guide to Neural Networks and Deep Learning [homepage on the internet]. 2020 [cited 2022 April 4]. Available from: wiki.pathmind.com
65. Noble WS. What is a support vector machine? *Nat Biotechnol.* 2006;24(12):1565–7. Doi: 10.1038/nbt1206-1565
66. Dietterich TG. Ensemble Methods in Machine Learning. In 2000. p. 1–15.
67. Dreiseitl S, Ohno-Machado L. Logistic regression and artificial neural network classification models: a methodology review. *J Biomed Inform.* 2002;35(5–6):352–9. Doi: 10.1016/s1532-0464(03)00034-0
68. Szolovits P, Patil RS, Schwartz WB. Artificial Intelligence in Medical Diagnosis. *Ann Intern Med.* 1988;108(1):80-7. Doi: 10.7326/0003-4819-108-1-80
69. Farahmand S, Shabestari O, Pakrah M, Hossein-Nejad H, Arbab M, Bagheri-Hariri S. Artificial Intelligence-Based Triage for Patients with Acute Abdominal Pain in Emergency Department; a Diagnostic Accuracy Study. *Adv J Emerg Med.* 2017;1(1):e5. Doi: 10.22114/AJEM.v1i1.11

70. Samareh A, Chang X, Lober WB, Evans HL, Wang Z, Qian X, Huang S. Artificial Intelligence Methods for Surgical Site Infection: Impacts on Detection, Monitoring, and Decision Making. *Surg Infect.* 2019;20(7):546-54. Doi: 10.1089/sur.2019.150
71. Bertsimas D, Masiakos PT, Mylonas KS, Wiberg H. Prediction of cervical spine injury in young pediatric patients: an optimal trees artificial intelligence approach. *J Ped Surg.* 2019;54(11):2353-7. Doi: 10.1016/j.jpedsurg.2019.03.007
72. Gödeke J, Muensterer O, Rohleder S. Artificial intelligence in pediatric surgery: Present and future. *Chirurg.* 2020;91(3):222-228. Doi: 10.1007/s00104-019-01051-3
73. Berg JTJSL. *Biochemie, Kapitel 28.* Vol. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin; 2003. 860–889 p.
74. Berg JTJSL. *Biochemie, Kapitel 29.* Vol. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin; 2003. 894–923 p.
75. Tang BMP, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RCY. The Use of Gene-Expression Profiling to Identify Candidate Genes in Human Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(7):676-84. Doi: 10.1164/rccm.200612-1819OC
76. Wong HR, Cvijanovich N, Allen GL, Lin R, Anas N, Meyer K, Freishtat RJ, Monaco M, Odoms K, Sakthivel B, Shanley TP. Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum. *Crit Care Med.* 2009;37(5):1558-66. Doi: 10.1097/CCM.0b013e31819fcc08
77. Cornell TT, Wynn J, Shanley TP, Wheeler DS, Wong HR. Mechanisms and Regulation of the Gene-Expression Response to Sepsis. *Pediatrics.* 2010;125(6):1248-58. Doi: 10.1542/peds.2009-3274
78. Murphy CG, Glickman JN, Tomczak K, Wang YY, Beggs AH, Shannon MW, Horwitz BH. Acute appendicitis is characterized by a uniform and highly selective pattern of inflammatory gene expression. *Mucosal Immunol.* 2008;1(4):297-308. Doi: 10.1038/mi.2008.13
79. Chawla LS, Toma I, Davison D, Vaziri K, Lee J, Lucas R, Seneff MG, Nyhan A, McCaffrey TA. Acute appendicitis: transcript profiling of blood identifies promising biomarkers and potential underlying processes. *BMC Med Genomics.* 2016;9(1):40. Doi: 10.1186/s12920-016-0200-y

80. Gliddon HD, Herberg JA, Levin M, Kaforou M. Genome-wide host RNA signatures of infectious diseases: discovery and clinical translation. *Immunology*. 2018;153(2):171–8. Doi: 10.1111/imm.12841
81. Gongidi P, Bellah RD. Ultrasound of the pediatric appendix. *Pediatr Radiol*. 2017;47(9):1091–100. Doi: doi: 10.1007/s00247-017-3928-4
82. Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):161. Doi: 10.1186/1471-2105-10-161
83. Neufeld MY, Bauerle W, Eriksson E, Azar FK, Evans HL, Johnson M, et al. Where did the patients go? Changes in acute appendicitis presentation and severity of illness during the coronavirus disease 2019 pandemic: A retrospective cohort study. *Surgery*. 2021;169(4):808–15. Doi: 10.1016/j.surg.2020.10.035
84. Rosenthal MG, Fakhry SM, Morse JL, Wyse RJ, Garland JM, Duane TM, et al. Where Did All the Appendicitis Go? Impact of the COVID-19 Pandemic on Volume, Management, and Outcomes of Acute Appendicitis in a Nationwide, Multicenter Analysis. *Annals of Surgery Open*. 2021 Mar;2(1):e048. Doi: 10.1097/AS9.0000000000000048
85. Scheijmans JCG, Borgstein ABJ, Puylaert CAJ, Bom WJ, Bachiri S, van Bodegraven EA, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on incidence and severity of acute appendicitis: a comparison between 2019 and 2020. *BMC Emerg Med*. 2021;21(1):61. Doi: 10.1186/s12873-021-00454-y
86. Köhler F, Acar L, van den Berg A, Flemming S, Kastner C, Müller S, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on appendicitis treatment in Germany—a population-based analysis. *Langenbeck's Arch Surg*. 2021;406(2):377–83. Doi: 10.1007/s00423-021-02081-4
87. Ceresoli M, Coccolini F, Magnone S, Lucianetti A, Bisagni P, Armao T, et al. The decrease of non-complicated acute appendicitis and the negative appendectomy rate during pandemic. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2021 Oct 12;47(5):1359–65. Doi: 10.1007/s00068-021-01663-7
88. Tankel J, Keinan A, Blich O, Koussa M, Helou B, Shay S, et al. The Decreasing Incidence of Acute Appendicitis During COVID-19: A Retrospective Multi-centre Study. *World J Surg*. 2020;44(8):2458–63. Doi: 10.1007/s00268-020-05599-8

89. Sheath C, Abdelrahman M, MacCormick A, Chan D. Paediatric appendicitis during the COVID-19 pandemic. *J Paediatr Child Health*. 2021;57(7):986–9. Doi: 10.1111/jpc.15359
90. Fisher JC, Tomita SS, Ginsburg HB, Gordon A, Walker D, Kuenzler KA. Increase in Pediatric Perforated Appendicitis in the New York City Metropolitan Region at the Epicenter of the COVID-19 Outbreak. *Ann Surg*. 2021;273(3):410–5. Doi: 10.1097/SLA.0000000000004426
91. Orthopoulos G, Santone E, Izzo F, Tirabassi M, Pérez-Caraballo AM, Corriveau N, et al. Increasing incidence of complicated appendicitis during COVID-19 pandemic. *Am J Surg*. 2021;221(5):1056–60. Doi: 10.1016/j.amjsurg.2020.09.026
92. Burgard M, Cherbanyk F, Nassiopoulos K, Malekzadeh S, Pugin F, Egger B. An effect of the COVID-19 pandemic: Significantly more complicated appendicitis due to delayed presentation of patients! *PLoS One*. 2021;16(5):e0249171. Doi: 10.1371/journal.pone.0249171
93. Gerall CD, DeFazio JR, Kahan AM, Fan W, Fallon EM, Middlesworth W, et al. Delayed presentation and sub-optimal outcomes of pediatric patients with acute appendicitis during the COVID-19 pandemic. *J Pediatr Surg*. 2021;56(5):905–10. Doi: 10.1016/j.jpedsurg.2020.10.008
94. Minderjahn MI, Schädlich D, Radtke J, Rothe K, Reismann M. Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts. *World J Pediatr*. 2018;14(5):504–9. Doi: 10.1007/s12519-018-0173-3
95. Reismann J, Schädlich D, Minderjahn MI, Rothe K, Reismann M. Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern. *Pediatr Surg Int*. 2018;35(3):335–40. Doi: 10.1007/s00383-018-4423-1
96. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*. 2009;113(7):1526–34. Doi: 10.1182/blood-2008-05-157818
97. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):626–35. Doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.001

98. Dimberg J, Rubér M, Skarstedt M, Andersson M, Andersson RE. Genetic polymorphism patterns suggest a genetic driven inflammatory response as pathogenesis in appendicitis. *Int J Colorectal Dis.* 2020;35(2):277-84. Doi: 10.1007/s00384-019-03473-1
99. Carvalho N, Barros A, Coelho H, Córias A, Botelho P, Cismasiu B, Moita L, Costa P. Increased IgE Deposition in Appendicular Tissue Specimens Is Compatible with a Type I Hypersensitivity Reaction in Acute Appendicitis. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:4194859. Doi: 10.1155/2021/4194859
100. Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon H-U. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* 2013;34(8):398–409. Doi: 10.1016/j.it.2013.04.002
101. Rawolle T, Reismann M, Minderjahn MI, Bassir C, Hauptmann K, Rothe K, Reismann J. Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated appendicitis. *Br J Radiol.* 2019;92(1099):20190102. Doi: 10.1259/bjr.20190102
102. Sangüesa-Nebot C, Llorens-Salvador R. Intestinal ultrasound in pediatrics. *Radiología (Engl Ed).* 2021;63(3):291-304. Doi: 10.1016/j.rx.2020.08.003
103. Mahankali SK, Ahamed SA, Gupta GSP, Razek AAKA. CT based Acute Appendicitis Severity Index for acute appendicitis and validate its effectiveness in predicting complicated appendicitis. *Emerg Radiol.* 2021;28(5):921-7. Doi: 10.1007/s10140-021-01950-1
104. Hao TK, Chung NT, Huy HQ, Linh NTM, Xuan NT. Combining Ultrasound with a Pediatric Appendicitis Score to Distinguish Complicated from Uncomplicated Appendicitis in a Pediatric Population. *Acta Inform Med.* 2020;28(2):114-8. Doi: 10.5455/aim.2020.28.114-118
105. Maita S, Andersson B, Svensson JF, Wester T. Nonoperative treatment for nonperforated appendicitis in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Surg Int.* 2020;36(3):261-9. Doi: 10.1007/s00383-019-04610-1
106. Pereyaslov AA, Stenyk RV, Bobak AI, Dvorakevych AO, Nykyforuk OM, Borova-Halay OE, Malovanyy B. Modern principles of diagnostic and treatment of acute appendicitis in children. *Paediatric Surgery Ukraine.* 2021;2(71):32-41. Doi: 10.15574/PS.2021.71.32

107. Hoffmann JC, Trimborn C-P, Hoffmann M, Schröder R, Förster S, Dirks K, Tannapfel A, Anthuber M, Hollerweger A. Classification of acute appendicitis (CAA): treatment directed new classification based on imaging (ultrasound, computed tomography) and pathology. *Int J Colorectal Dis.* 2021;36(11):2347-60. Doi: 10.1007/s00384-021-03940-8
108. Nijssen DJ, van Amstel P, van Schuppen J, Eeftinck Schattenkerk LD, Gorter RR, Bakx R. Accuracy of ultrasonography for differentiating between simple and complex appendicitis in children. *Pediatr Surg Int.* 2021;37(7):843-9. Doi: 10.1007/s00383-021-04872-8
109. Coyne SM, Zhang B, Trout AT. Does Appendiceal Diameter Change With Age? A Sonographic Study. *AJR Am J Roentgenol.* 2014;203(5):1120–6. Doi: 10.2214/AJR.13.12205
110. Reismann J, Romualdi A, Kiss N, Minderjahn MI, Kallarackal J, Schad M, et al. Diagnosis and classification of pediatric acute appendicitis by artificial intelligence methods: An investigator-independent approach. *PLoS One.* 2019;14(9):e0222030. Doi: 10.1371/journal.pone.0222030
111. Akmese OF, Dogan G, Kor H, Erbay H, Demir E. The Use of Machine Learning Approaches for the Diagnosis of Acute Appendicitis. *Emerg Med Int.* 2020;2020:7306435. Doi: 10.1155/2020/7306435
112. Aydin E, Türkmen İU, Namli G, Öztürk Ç, Esen AB, Eray YN, Eroglu E, Akova F. A novel and simple machine learning algorithm for preoperative diagnosis of acute appendicitis in children. *Pediatric Surgery International.* 2020;36(6):735-42. Doi: 10.1007/s00383-020-04655-7
113. Henn J, Bunes A, Schmid M, Kalff JC, Matthaei H. Machine learning to guide clinical decision-making in abdominal surgery - a systematic literature review. *Langenbecks Arch Surg.* 2022;407(1):51-61. Doi: 10.1007/s00423-021-02348-w
114. Caruso M, Ricciardi C, Delli Paoli G, Di Dato F, Donisi L, Romeo V, Petretta M, Iorio R, Cesarelli G, Brunetti A, Maurea S. Machine Learning Evaluation of Biliary Atresia Patients to Predict Long-Term Outcome after the Kasai Procedure. *Bioengineering.* 2021;8(11):152. Doi: 10.3390/bioengineering8110152

115. Kuo Y-Y, Huang S-T, Chiu H-W. Applying artificial neural network for early detection of sepsis with intentionally preserved highly missing real-world data for simulating clinical situation. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2021;21(1):290. Doi: 10.1186/s12911-021-01653-0
116. Aguilar C, Regensburger AP, Knieling F, Wagner AL, Siebenlist G, Woelfle J, Koehler H, Hoerning A, Jüngert J. Pediatric Buried Bumper Syndrome: Diagnostic Validity of Transabdominal Ultrasound and Artificial Intelligence. *Ultraschall Med.* 2021. Online ahead of Print. Doi: 10.1055/a-1471-3039
117. Gorincour G, Monneuse O, Ben Cheikh A, Avondo J, Chaillot P-F, Journe C, Youssef E, Lecomte J-C, Thomson V. Management of abdominal emergencies in adults using telemedicine and artificial intelligence. *J Visc Surg.* 2021;158(3S):S26-31. Doi: 10.1016/j.jviscsurg.2021.01.008
118. Marcinkevics R, Reis Wolfertstetter P, Wellmann S, Knorr C, Vogt JE. Using Machine Learning to Predict the Diagnosis, Management and Severity of Pediatric Appendicitis. *Front Pediatr.* 2021;9:662183. Doi: 10.3389/fped.2021.662183
119. Kiss N, Minderjahn M, Reismann J, Svensson J, Wester T, Hauptmann K, Schad M, Kallarackal J, von Bernuth H, Reismann M. Use of gene expression profiling to identify candidate genes for pretherapeutic patient classification in acute appendicitis. *BJS Open.* 2021;5(1):zraa045. Doi: 10.1093/bjsopen/zraa045
120. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble. *Ann Rev Immunol.* 1988;6(1):629–62. Doi: 10.1146/annurev.iy.06.040188.003213
121. Szomolanyi-Tsuda E, Brien JD, Dorgan JE, Welsh RM, Garcea RL. The Role of CD40-CD154 Interaction in Antiviral T Cell-Independent IgG Responses. *J Immunol.* 2000;164(11):5877–82. Doi: 10.4049/jimmunol.164.11.5877
122. Huang W-Y, Chen C-Y, Chang Y-J, Lee E-P, Wu H-P. Serum Soluble CD40 Ligand in Predicting Simple Appendicitis and Complicated Appendicitis at Different Time Points in Children. *Front Pediatr.* 2021;9:676370. Doi: 10.3389/fped.2021.676370
123. Reismann J, Kiss N, Reismann M. The application of artificial intelligence methods to gene expression data for differentiation of uncomplicated and complicated appendicitis in children and adolescents - a proof of concept study. *BMC Pediatr.* 2021;21(1):268. Doi: 10.1186/s12887-021-02735-8

124. Tang BMP, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RCY. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(7):676-84. Doi: 10.1164/rccm.200612-1819OC
125. Donaldson JG, Jackson CL. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(6):362–75. Doi: 10.1038/nrm3117

DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Karin Rothe, Direktorin der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die stetige Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Habilitationsschrift bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann und Betreuer dieser Habilitation, PD Dr. med. Marc Reismann. Ich danke dir für die langen Spaziergänge in den letzten Jahren, auf denen wir so viel über unsere Ideen, Paper und Projekte gesprochen haben. Dieses Forschungsprojekt bedeutet dir so viel und die Habilitation ist dir gewidmet.

„Danke“ sagen möchte ich auch beiden Doktorandinnen, die ich im Rahmen dieser Habilitation auf ihrem Weg zum Dokortitel begleiten durfte: Dr. med. Nina Dietze und Dr. med. Tanja Rawolle sowie den Doktorand*innen, deren Studien in diese Arbeit mit eingeflossen sind: Dr. med. Maximiliane I. Minderjahn, Dr. med. Natalie Kiss und Dr. med. Dag Schädlich.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Martina Koch für die Unterstützung bei der Anfertigung der gemeinsamen Studien bedanken. Sie war mir stets ein Vorbild auf dem Weg zur eigenen Habilitation.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die immerwährende Unterstützung und liebevollen Worte auf dem langen Weg zur Habilitation.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

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.

.....
Datum

.....
Unterschrift