

Diplomarbeit

**MIKROBIOM UND ARCHAEOM DER APPENDIX VON
KINDERN MIT AKUTER APPENDIZITIS
Eine Pilotstudie**

eingereicht von

Kevin Brunnader

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie

und am

Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Georg Singer

und

Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ habil. rer. nat. Christine Moissl-Eichinger

Graz, am 22. April 2021

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 22. April 2021

Kevin Brunnader eh.

Danksagungen und Vorwort

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Diplomarbeitbetreuern Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Georg Singer, Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ habil. rer. nat. Christine Moissl-Eichinger und allen, die mich direkt an der Vollendung dieser Arbeit unterstützt haben, im Speziellen Marcus Blohs, MSc, bedanken. Ohne Eure Tatkraft und Eure Einbindung in Euer Team wäre vieles nicht möglich gewesen.

Natürlich gebührt auch meiner Familie, meiner Partnerin Susannah und meinen Freunden ein großes Dankeschön, da sie mich das ganze Studium hindurch unterstützt und begleitet haben. Speziell möchte ich mich auch bei meinen Brüdern Lars und Marc, meinen Freunden Patrick R., Patrick S., Robert, Michael, Carina und Sabine bedanken. Sie hatten immer wieder ein offenes Ohr und wichtige Worte für mich bereit. Ich danke meinen Eltern, dass sie mich wo es nur möglich war unterstützen. Danke Mama und Papa, ohne Euch geht nichts.

Mein Dank richtet sich auch an das Österreichische Bundesheer, welches mir während meinem Studium eine starke finanzielle Basis ermöglichte und mir einiges an Zeitmanagement und Selbstdisziplin beibrachte. Besonders möchte ich mich bei Kurt H. bedanken, der meinen militärischen Mentor darstellt und den ich darüber hinaus einen guten Freund nennen darf.

Liebe Leser*innen, Sie sehen, dass eine solche Diplomarbeit bzw. ein ganzes Studium nicht nur von einem allein getragen wird. Es braucht viele Menschen im Hintergrund, die dem Verfasser den Rücken stärken und somit ein Umfeld schaffen, in dem ein rasches Vorankommen erst möglich gemacht wird.

Um alle hier aufzulisten, die mich in irgendeiner Weise in den letzten Jahren unterstützt haben, müsste man dieser Arbeit noch einige Seiten anfügen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	16
1.1	Grundlagen	16
1.1.1	Der Mikroorganismus	16
1.1.2	Das Mikrobiom	16
1.1.3	Die Appendix vermiformis	21
1.2	Appendizitis	24
1.2.1	Definition	24
1.2.2	Epidemiologie	24
1.2.3	Ätiologie und Pathogenese	24
1.2.4	Morphologie	25
1.2.5	Klinik	26
1.2.6	Diagnostik	26
1.2.7	Differentialdiagnosen	29
1.3	Appendizitis und Mikrobiom	30
1.4	Therapie der akuten Appendizitis	30
1.4.1	Allgemein	30
1.4.2	Laparoskopische Appendektomie	30
1.4.3	Offene Appendektomie	31
1.4.4	Konservative Therapie der Appendizitis	31
1.5	Ziel der Arbeit	32
2	Materialien und Methoden	33
2.1	Patient*innen-Kohorte	33
2.2	Proben	35
2.3	Ethische Überlegungen	36
2.4	Auswahl einer geeigneten Methode zur DNA-Extraktion	36
2.4.1	Die Erprobung der einzelnen Verfahren	38
2.5	DNA-Extraktion aus menschlichen Appendixproben	42
2.5.1	Verarbeitung der Proben vor der Extraktion	42
2.5.2	DNA-Extraktion	43
2.5.3	NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit	43
2.6	Polymerase Chain Reaction (PCR)	44
2.7	Elektrophoretische Überprüfung der PCR-Produkte	45
Diplomarbeit		BRUNNADER Kevin
		4

2.8	Sequenzierung	48
2.9	Statistische Auswertung	49
3	Resultate	50
3.1	Analyse der Metadaten	50
3.2	Analyse des Mikrobioms	51
3.2.1	Analyse des Bakterioms	52
3.2.2	Analyse des Archaeoms	60
3.2.3	Analyse des Mykobioms	62
4	Diskussion	64
4.1	Limitierungen der Studie	64
4.2	Korrelationen innerhalb der Metadaten	64
4.3	Zusammensetzung der Proben gegliedert nach mikrobiellen Domänen bei unterschiedlichem Schweregrad	65
4.4	Bakterielle Besiedelung in Korrelation mit dem Schweregrad der Appendizitis	66
4.5	Bakterielle Besiedelung in Korrelation mit dem Alvarado-Score	67
4.6	Bakterielle Besiedelung in Korrelation mit dem CRP-Wert	67
4.7	Archaeelle Besiedelung in Korrelation mit dem Schweregrad der Appendizitis	68
4.8	Fungale Besiedelung in Korrelation mit dem Schweregrad der Appendizitis	69
4.9	Mögliche Ansätze zur Therapie der akuten Appendizitis bei Kindern und Jugendlichen	69
4.10	Ausblick	70
4.11	Zusammenfassung	70
5	Literaturverzeichnis	72
6	Anhang	80
6.1	Protokolle der Extraktionskits	80
6.1.1	XSB-Extraktion-Protokoll	80
6.1.2	E.Z.N.A.® Stool DNA Kit	81
6.1.3	DNeasy® PowerSoil® Kit	84
6.1.4	Monarch® Genomic DNA Purification Kit	86
6.1.5	NEBNext® Microbime DNA Enrichment Kit	88
6.2	PowerBead® Tubes und deren Gewichte	93

6.3	Metadaten der Studie	95
6.4	Bakterielle Zusammensetzung der Proben	98
6.5	Bakteriom und Alvarado-Score	99
6.6	Bakteriom und CRP-Wert	100

Abkürzungen

A&E	accident and emergency department (dt.: chirurgische Notaufnahme)
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
CMV	Cytomegalie-Virus
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
gDNA	chromosomale DNA („genomic DNA“)
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobasen
LEfSe	Linear discriminant analysis Effect Size (dt.: lineare Diskriminanzanalyse Effektgröße)
MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µM	Mikromol
mM	Millimol
mL	Milliliter
PAS	Pediatric Appendicitis Score (dt.: Score für kindliche Appendizitis)
PBS	Phosphate Buffered Saline (dt.: phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (dt.: Polymerasekettenreaktion)
U	Units
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
ZMF	Zentrum für Medizinische Forschung der MedUni Graz

Glossar

Alvarado-Score	Score zur Erhebung der Wahrscheinlichkeit einer Appendizitis
Appendizitis	entzündliche Erkrankung des Wurmfortsatzes
Appendizitiden	Plural von Appendizitis
Archaeom	Gesamtheit der Archaeen in einem Biotop
archaeell	Archaeen-bezogen
Bakteriom	Gesamtheit der Bakterien in einem Biotop
Calypso	Programm zur Analyse mikrobieller Daten (1)
Divertikulitis	Entzündung von Divertikeln im Dickdarm
Mykobiom	Gesamtheit der Pilze in einem Biotop
fungaal	Pilz-bezogen
Ischämie	Minderdurchblutung
Meckel-Divertikel	Divertikel im Bereich des Dünndarms

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Domänen des Lebens; übernommen aus (10).....	18
Abbildung 2: Schema Exzision der Probe aus der Appendix mit einem sterilen Einmalskalpell. Die Appendix vermiformis mit ihren Schichten in schematischer Darstellung angelehnt an die Darstellung im Taschenatlas der Anatomie, Band 2: Innere Organe von Fritsch und Kühnel (46).	42
Abbildung 3: Gelbanden der Elektrophorese; Mit dem roten "*" gekennzeichnete Banden signalisieren bakterielle bzw. archaeele DNA mit der erwarteten Bandlänge. Mit „PC“ bezeichnete Banden sind Positivkontrollen, mit „NC“ bezeichnete Negativkontrollen. Die mit „M“ bezeichneten Taschen wurden mit dem FastRuler Low Range DNA Ladder® (Thermo Scientific) befüllt.	46
Abbildung 4: Gelbanden der Elektrophorese; Mit dem roten "*" gekennzeichnete Banden signalisieren archaeele bzw. fungale DNA mit der erwarteten Bandlänge. Mit „PC“ bezeichnete Banden sind Positivkontrollen, mit „NC“ bezeichnete Negativkontrollen. Die mit „M“ bezeichneten Taschen wurden mit dem FastRuler Low Range DNA Ladder® (Thermo Scientific) befüllt. Für die Domäne der Fungi konnte keine entsprechende Konzentration erreicht werden, dass Banden sichtbar hätten gemacht werden können.	47
Abbildung 5: Gelbanden der Elektrophorese; Für die Domäne der Fungi konnte keine entsprechende Konzentration erreicht werden, dass Banden sichtbar hätten gemacht werden können. Mit „PC“ bezeichnete Banden sind Positivkontrollen, mit „NC“ bezeichnete Negativkontrollen. Die mit „M“ Taschen wurden mit dem FastRuler Low Range DNA Ladder® (Thermo Scientific) befüllt.	48
Abbildung 6: Zusammensetzung der Proben hinsichtlich des Königreichs und des Schweregrades; blau: Bakteriom („Bacteria“), hellblau: Archaeom („Archaea“), grün: Pilze („Fungi“).	52
Abbildung 7: Bakteriom und Schweregrad der Appendizitis auf Gattungsebene („genus“); Gruppen: hochgradig („high“; rot), mittelgradig („medium“; grau) und niedriggradig („low“; blau);	54
Abbildung 8: LEfSe-Analyse von Bakteriom und Schweregrad der Appendizitis auf Genus-Ebene; Gruppen: hochgradig ("high"; rot), mittelgradig ("medium"; blau).	55
Abbildung 9: Zusammenhang zwischen Schweregrad und relativer Abundanz von <i>Fusobacterium</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Solobacterium</i> und <i>Peptostreptococcus</i> bei hochgradiger (4-5; rot), mittelgradiger (3; blau) und niedriggradiger (1 - 2; grau) Appendizitis auf Genus-Ebene; ** 0,001 ≤ p < 0,01, * 0,01 ≤ p < 0,05	56
Abbildung 10: Zusammenhang zwischen Schweregrad und Abundanz von <i>Akkermansia</i> , <i>Bilophila</i> , <i>Desulfovibro</i> , <i>Eggerthella</i> und <i>Tannerella</i> bei hochgradiger (4-5; rot), mittelgradiger (3; blau) und niedriggradiger (1 - 2; grau) Appendizitis auf Genus-Ebene; ** 0,001 ≤ p < 0,01, * 0,01 ≤ p < 0,05	56

Abbildung 11: LEfSe-Analyse von Bakteriom und Alvarado-Score auf RSV-Ebene; rot: hoher Alvarado-Score („high“; 7 – 10), blau: niedriger Alvarado-Score („low“; 0 – 4).....	58
Abbildung 12: Alvarado-Score und Abundanz (Dotplot 2) auf RSV-Ebene von <i>Escherichia/Shigella</i> (RSV 1196), <i>Gemella</i> (RSV 514), <i>Bacteroides</i> (RSV 243), <i>Campilobacter</i> (RSV 1016) und <i>Parabacteroides</i> (RSV 1062) bei hohem (7 - 10; rot), mittleren (5 - 6; blau) und niedrigem (0 – 4; grau) Alvarado-Score; ** 0,001 ≤ p < 0,01, * 0,01 ≤ p < 0,05.....	58
Abbildung 13: Abundanzen Bakterien-RSV bei hohem CRP-Wert auf RSV-Ebene; rot: hoher CRP-Wert (> 40 mg/L).....	59
Abbildung 14: CRP-Werte und Abundanz von <i>Alistipes</i> (RSV 809), <i>Gemella</i> (RSV 514), <i>Parabacteroides</i> (RSV 132) und <i>Peptostreptococcus</i> (RSV 1239) auf RSV-Ebene; rot: hoher CRP-Wert („high“; >40 mg/L), blau: erhöhter CRP-Wert („increased“; 5 – 40 mg/L), grau: normaler CRP-Wert („normal“; <5 mg/L); *** p < 0,001, ** 0,001 ≤ p < 0,01, * 0,01 ≤ p < 0,05.....	60
Abbildung 15: Zusammensetzung der Proben hinsichtlich des Archaeoms und des Schweregrades auf Gattungsebene; hellblau: <i>Methanogranum</i> , dunkelblau <i>Methanobrevibacter</i> , grün: <i>Methanosphaera</i> ; „high“: hoher Schweregrad, „medium“: mittlerer Schweregrad, „low“: niedriger Schweregrad der Appendizitis	61
Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Schweregrad und Abundanz von <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanosphaera</i> und <i>Methanogranum</i> bei hochgradiger (4-5; rot), mittelgradiger (3; blau) und niedriggradiger (1 - 2; grau) Appendizitis auf Genus-Ebene;.....	62
Abbildung 17: Zusammensetzung der Proben hinsichtlich des Mykobioms und des Schweregrades auf Gattungsebene; Der Großteil des Mykobioms konnte nicht klassifiziert werden (gelb & braun).....	63
Abbildung 18: Zusammenhang zwischen Schweregrad und Abundanz von <i>Candida</i> und <i>Paraphoma</i> bei hochgradiger (4-5; rot), mittelgradiger (3; blau) und niedriggradiger (1 - 2; grau) Appendizitis auf Genus-Ebene.....	63
Abbildung 19: Bakterielle Zusammensetzung der einzelnen Proben in Hinsicht auf den Schweregrad der Appendizitis.....	98
Abbildung 20: Bakteriom und Alvarado-Score (LEfSe-Analyse) auf Gattungsebene; rot: hoher Alvarado-Score („high“; 7 – 10), blau: niedriger Alvarado-Score („low“; 0 – 4).....	99
Abbildung 21: Alvarado-Score und Abundanz (Dotplot 2) von <i>Escherichia/Shigella</i> , <i>Gemella</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Campylobacter</i> und <i>Parabacteroides</i> bei hohem (7 - 10; rot), mittleren (5 - 6; blau) und niedrigem (0 – 4; grau) Alvarado-Score auf Gattungsebene; ** 0,001 ≤ p < 0,01, * 0,01 ≤ p < 0,05.....	99
Abbildung 22: Bakteriom und CRP-Wert (LEfSe-Analyse) auf Gattungsebene; rot: hoher CRP-Wert (>40; high), blau: niedriger CRP-Wert (≤5; low).....	100
Abbildung 23: CRP-Wert und Abundanz (Boxplot und Dotplot 2) von <i>Alistipes</i> , <i>Gemella</i> und <i>Pseudomonas</i> bei hohem (>40; rot), mittleren (≤40; blau) und	

niedrigem (≤ 5 ; grau) CRP-Wert auf Gattungsebene; *** $p < 0,001$, ** $0,001 \leq p < 0,01$, * $0,01 \leq p < 0,05$ 100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alvarado-Score	27
Tabelle 2: Interpretation Alvarado-Score übernommen aus (26).....	27
Tabelle 3: Pediatric Appendicitis Score (PAS).....	28
Tabelle 4: Alter und PAS (Mittelwert und Standardabweichung (SD)) von Patient*innen mit verschiedenen Stadien bei Appendizitis und ohne Appendizitis übernommen aus (27)	28
Tabelle 5: Erhobene Parameter der Metadaten	34
Tabelle 6: Einteilung der Metadaten.....	35
Tabelle 7: Bezeichnungen der Schweine-Proben (Bead-Beating-Röhrchen) und ihr Gewicht (in Gramm); Monarch® Genomic DNA Purification Kit (M), E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (St), DNeasy® PowerSoil® Kit (So), XS-Puffer (X)	37
Tabelle 8: Bezeichnungen der Schweine-Proben (Sammelröhrchen) und ihr Gewicht (in Gramm); Monarch® Genomic DNA Purification Kit (M), E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (St), DNeasy® PowerSoil® Kit (So), XS-Puffer (X)	38
Tabelle 9: Benötigte Chemikalien für den XS-Puffer (XSB).....	38
Tabelle 10: Benötigte Geräte für die Probenextraktion mit XS-Puffer (XSB).....	39
Tabelle 11: E.Z.N.A.® Stool Kit für die DNA-Extraktion.....	39
Tabelle 12: PowerSoil® Kit für die Probenextraktion.....	40
Tabelle 13: Benötigte Geräte für die Probenextraktion mit dem PowerSoil® Kit ...	40
Tabelle 14: Monarch® Kit für die Probenextraktion.....	41
Tabelle 15: NEBNext® Enrichment Kit für die Anreicherung der Proben	44
Tabelle 16: Materialien für die PCR von bakteriellem Genom.....	44
Tabelle 17: Herstellungsblatt für die PCR von bakteriellem Genom.....	45
Tabelle 18: Korrelationen innerhalb der Metadaten. Interpretation Korrelationskoeffizient r : $0,0 \leq r < 0,2 \rightarrow$ kein bis geringer, $0,2 \leq r < 0,5$ schwacher bis mäßiger, $0,5 \leq r < 0,8$ deutlicher, $0,8 \leq r \leq 1,0$ hoher bis perfekter linearer Zusammenhang. Interpretation p-Wert: $p < 0,001$ höchst signifikant, $0,001 \leq p < 0,01$ sehr signifikant, $0,01 \leq p < 0,05$ signifikant.....	51
Tabelle 19: Auflistung der 15 Bakteriengattungen mit der höchsten Abundanz, aufsummiert über alle 60 Patient*innen.....	53
Tabelle 20: Menge an Material bei verschiedenen Gewebearten (Monarch® Genomic DNA Purification Kit)	86
Tabelle 21: Menge an Proteinase K bei verschiedenen Gewebearten (Monarch® Genomic DNA Purification Kit)	86
Tabelle 22: Gewichte PowerBead® Tubes (ungefüllt/gefüllt/Differenz).....	93
Tabelle 23: Metadaten.....	95

Zusammenfassung

Zielsetzung: Die akute Blinddarmentzündung – Appendizitis – gehört zu den häufigsten kinderchirurgischen Notfällen. Studien zeigen, dass nicht notwendigerweise die Obstruktion des Organes zur Appendizitis führt, sondern dessen mikrobielle Besiedelung. Einige Studien haben Veränderungen des Mikrobioms, also der Zusammensetzung der Bakterien, der Appendix bei Kindern mit akuter Appendizitis bereits gezeigt. Diese beinhalten aber die Daten einer überschaubaren Zahl von Kindern und Jugendlichen. Die Archaeen bilden neben Bakterien und Eukaryoten eine der drei Domänen, in die alle zellulären Lebewesen eingeteilt werden. Ihre Gesamtheit wird das Archaeom genannt. Derzeit ist die genaue Zusammensetzung des Archaeoms der kindlichen Appendix (gemessen mit next-generation sequencing Techniken) noch unerforscht. Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, das Archaeom und Mikrobiom der Appendix von Kindern und Jugendlichen mit akuter Appendizitis zu beschreiben.

Studiendesign und Methoden: Für die Durchführung der Studie wurden im Zeitraum von April 2019 bis Juni 2019 insgesamt 60 Patient*innen im Alter von 5 bis 17 Jahren erfasst, die mit einer akuten Appendizitis an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie der Medizinischen Universität Graz operativ behandelt wurden. Intraoperativ wurde den Patient*innen ein Stück der entfernten Appendix entnommen. Das Mikrobiom und Archaeom dieser Proben wurden mittels next-generation sequencing untersucht.

Ergebnisse: Die Bakteriengattungen *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Parvimonas*, *Akkermansia*, *Solobacterium* und *Eggerthella* waren Indikatoren für hochgradige Appendizitiden. *Escherichia coli* und *Gemella* traten vermehrt bei hohen Alvarado-Scores auf. Bei Patient*innen mit hohen CRP-Werten (C-reaktives Protein) fand man *Alistipes* und *Gemella* am häufigsten. Es konnten keine signifikanten Abundanzunterschiede zwischen hoch- und niedriggradigen Appendizitiden hinsichtlich des Archaeoms und Mykobioms gefunden werden. *Methanobrevibacter* war bei schweren Appendizitiden tendenziell verringert, *Candida* tendenziell erhöht.

Schlussfolgerung: Das Mikrobiom der Appendix vermiformis bei Kindern und Jugendlichen ist bei einer akuten Appendizitis verändert. Es besteht eine vermehrte Besiedelung von gewissen bakteriellen Gattungen, welche als mögliches Ziel einer Therapie gesehen werden können. Auch eine Tendenz der verstärkten Besiedelung mit bestimmten Pilzen konnte beobachtet werden. Tendenziell lässt sich für das Archaeom ein protektiver Aspekt erkennen, wobei hierfür keine Signifikanz gefunden werden konnte.

Abstract

Objective: Acute appendicitis is one of the most common abdominal emergencies in paediatric surgery. Latest studies have shown that obstructions do not necessarily cause acute appendicitis, but the composition of bacterial population. Some studies have already described alterations of the appendiceal microbiome in children with acute appendicitis. However, these studies have included a limited number of children and adolescents only. Besides bacteria and fungi, archaea form one of three domains of cellular life. In their entirety, they are called archaeome. However, the composition of the human archaeome of the appendix of children is unknown. The aim of this study was to describe the appendiceal archaeome and microbiome of children and adolescents with acute appendicitis.

Patients and Methods: Between April 2019 to June 2019 appendiceal samples of 60 patients were collected and analysed. Patients included were 5 to 17 years old and had an acute appendicitis that was diagnosed at the Department of Paediatric and Adolescent Surgery of the Medical University of Graz. During appendectomy samples were taken from the removed appendices. The microbiome and archaeome of the appendix was analyzed with next generation sequencing.

Results: Higher abundance of bacterial genera *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Parvimonas*, *Akkermansia*, *Solobacterium* and *Eggerthella* indicated a high severity of acute appendicitis. *Escherichia coli* and *Gemella* were highly abundant in samples with high Alvarado-Scores. Samples with high levels of CRP (C-reactive protein) were commonly colonized with *Alistipes* and *Gemella*. No significant differences in abundance of the archaeome and mykobiome in appendices with high severity appendicitis were found. The abundance of *Methanobrevibacter* tended to be reduced in samples with severe appendicitis. *Candida*'s abundance tended to be increased in appendices with severe appendicitis.

Conclusion: The microbiome of appendices in children and adolescents with acute appendicitis is altered. There is an increased population of certain bacteria, which could be a potential target of future therapy. Moreover, there is a tendency of higher population of certain fungi in appendices with acute appendicitis.

1 Einleitung

1.1 Grundlagen

1.1.1 Der Mikroorganismus

Als Mikroorganismen bezeichnet man alle Organismen, die mit dem bloßen Auge nicht erkennbar sind. Zu ihnen zählen *Viren*, *Pilze*, *Protozoen*, *Mikro-Algen*, *Bakterien* und *Archaeen*. Grundsätzlich kann man diese Kleinstorganismen als *pathogen* (krankheitserregend) und *apathogen* (nicht-krankheitserregend) einteilen. Die pathogenen Mikroorganismen können weiter in *fakultativ* und *obligat* pathogene Mikroorganismen unterteilt werden. Fakultativ pathogene Mikroorganismen rufen, im Gegensatz zu obligat pathogenen, welche auch bei immunkompetenten Wirten Krankheiten auslösen können, nur in immungeschwächten Wirtsorganismen eine Erkrankung hervor (2–4).

Diese pathogenen Mikroorganismen werden als Erreger bezeichnet und halten sich oft in einer parasitären Weise im Wirtsorganismus auf. Erreger vermehren sich unter Verwendung der durch den Wirt bereitgestellten Nährstoffe im Wirtsorganismus (2–4).

1.1.2 Das Mikrobiom

Die Gesamtheit der Mikroorganismen und den Ort ihrer Aktivität, bezeichnet man als Mikrobiom (5). Dieses kann sich aus den jeweiligen Vertretern der Mikroorganismen in unterschiedlicher Konstellation zusammensetzen. Der Mensch wird in der Regel vom körpereigenen Mikrobiom nicht krank, ganz im Gegenteil, es dient gewissen physiologischen Abläufen und dem Erhalt der Gesundheit (6,7). Das Mikrobiom kann symbiotisch, kommensal und pathogen auf den Wirtsorganismus einwirken (4,8).

1.1.2.1 Klassifikation anhand des Zusammenlebens mit anderen Mikroorganismen

1.1.2.1.1 Symbiose

Eine symbiotische Lebensweise kann man z.B. beim Menschen auf der Haut bzw. im Darm beobachten. Hier haben sowohl der Wirt als auch das Mikrobiom einen Nutzen vom Zusammenleben. Zum Beispiel stellt das Mikrobiom des Darms einen wesentlichen Faktor für die Physiologie der Verdauung und trägt zum Stoffwechsel des Wirtsorganismus bei (6).

Das Mikrobiom ist aber auch ein protektiver Faktor gegenüber Umwelteinflüssen. Viele Bakterien zum Beispiel produzieren ein saures Milieu, welches für andere, potentiell pathogene Mikroorganismen keine optimale Grundlage darstellt. Neue Studien sehen sogar einen Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Besiedelung des Darms und der menschlichen Psyche (7).

1.1.2.1.2 Kommensalismus

Bei dieser Lebensweise lebt der Kommensale von der Nahrung des Wirtes, ohne diesen zu schädigen oder zu beeinträchtigen. Es profitiert sozusagen eine Art von einer anderen, ohne deren Lebensweise und Nahrungsaufnahme erheblich zu beeinflussen (4).

1.1.2.1.3 Parasitismus

Bei dieser Beziehung kommt es zu einem Ausnützen des Wirtes durch den Parasiten, wobei der Wirt Schaden erleidet. Der Parasit („Schmarotzer“) entnimmt dem Wirt Nährstoffe und scheidet oft giftige Stoffwechselprodukte aus. Ein Beispiel ist die Amöbe *Entamoeba histolytica*, die Zellen der Darmschleimhaut zerstört und somit eine Entzündung des Darms (Enteritis) hervorruft, die zur tropischen Amöbenruhr führt (4).

1.1.2.2 Klassifikation anhand der Zelltypen

Grundsätzlich können Zellen dadurch unterschieden werden, ob sie einen durch eine Membran umgebenen Zellkern besitzen, oder nicht. Zellen, die einen solchen Zellkern aufweisen, bezeichnet man als *Eucyten*. Jene, die keinen membranbegrenzten Zellkern besitzen, nennt man *Protocyten* (4,5).

1.1.2.2.1 Prokaryonten

Lebewesen, die aus Protocyten bestehen, nennt man Prokaryonten. Dazu zählen Bakterien und Archaeen. Sie sind einzellig, leben aber häufig in Verbänden zusammen (4,5).

1.1.2.2.2 Eukaryonten

Hierzu zählen Lebewesen, die aus Eucyten aufgebaut sind, wie Einzeller, Pilze, Tiere und Pflanzen (4,5).

1.1.2.3 Klassifikation anhand der Domänen

Das Leben auf der Erde wird in drei Domänen unterteilt: Bakterien, Archaeen und Eukaryonten. Alles Leben wird jeweils einem dieser drei Königreiche zugeteilt, welche sich durch ihren Aufbau, Stoffwechsel und ihre Lebensweise unterscheiden (9).

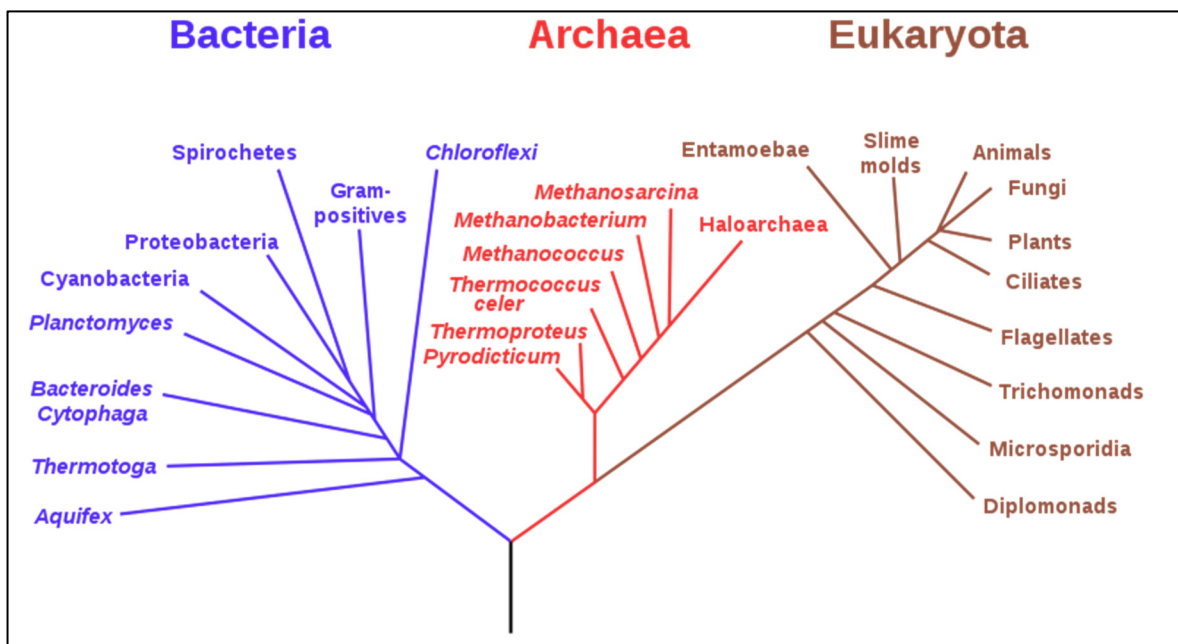


Abbildung 1: Die Domänen des Lebens; übernommen aus (10)

1.1.2.3.1 Bakterien

Diese Lebewesen sind, wie vorhin erwähnt, Prokaryonten. Ihre Erbinformation, sprich DNA, liegt frei im Cytoplasma als Nukleoid, auch als Bakterien-Chromosom bezeichnet, vor (4). Eine umfassende Störung der bakteriellen DNA kann nicht kompensiert werden, ein Umstand, den sich einige Antibiotika zu Nutze machen.

Dadurch wird die bakterielle Vervielfältigung gehemmt und das Bakterium stirbt ab (4). Im Ring vorliegende Chromosomen, wie eben die der Bakterien, benötigen keine Telomere für ihre Replikation. Zusätzlich liegen kleinere DNA-Fragmente, genannt *Plasmide*, im Cytoplasma vor, die unabhängig vom Nukleoid vererbt werden. Aus der Vererbung dieser Plasmide resultieren häufig Antibiotika-Resistenzen (4). Die Fortpflanzung der Bakterien erfolgt durch Mitose, sprich durch asexuelle Zellteilung (4). Ihr Inneres wird durch eine Zellwand, deren zentraler Baustein Murein, ein Peptidoglycan, darstellt, zur Umwelt hin begrenzt. Aufgrund der Zellwand lassen sich Bakterien weiter in Gram-positive und Gram-negative Individuen untergliedern. Dieser Aufteilung liegt die Gram-Färbemethode für Bakterien zu Grunde (4). Ist ein Bakterium anfärbbar, d.h. kann der Farbstoff-Iod-Komplex im Zellinneren nicht mit Ethanol extrahiert werden, dann ist es Gram-positiv, wenn nicht, dann Gram-negativ. Gram-Positivität tritt dann auf, wenn Murein ca. 50% der Zellwand-Bausteine einnimmt. Grundsätzlich kann gesagt werden, dass Gram-positive Zellwände eine geringere Komplexität aufweisen als Gram-negative (4). Gram-Negativität ist dann gegeben, wenn der Murein-Gehalt der Zellwand etwa bei 5-10% liegt. Gram-negative Zellwände besitzen einen periplasmatischen Raum, dessen Inhalt Peptidoglycane vorweist, und eine äußere Membran, die Lipopolysaccharid-haltig ist. Dieser Aufbau führt zu einer Barriere für Antibiotika, welche bei einer Therapie zuerst überwunden werden muss. Lipopolysaccharide sind für andere Organismen oft toxisch (4). Das Spektrum der Einflüsse von Bakterien könnte abwechslungsreicher nicht sein: Zum einen sind Bakterien häufig Produzenten von Toxinen, Stoffwechselprodukte, die zu Erkrankungen eines Organismus führen können. Zum anderen können sie aber auch auf den Organismus, den sie bewohnen, positive Einflüsse haben. Nennenswert sind hier besonders Darm und Haut des Menschen. Hier tragen Bakterien einerseits zum physiologischen Stoffwechsel bei und sind andererseits ein protektiver Faktor gegenüber Pathologien (3,4).

1.1.2.3.2 Archaeen

Archaeen sind prokaryotische Mikroorganismen, welche Merkmale von Bakterien und Eukaryoten in sich vereinen. Sie wurden vergleichsweise erst spät, gegen Ende des 20. Jahrhunderts, entdeckt. Die Erstbeschreiber Carl Woese und George Fox definierten die Archaeen in ihrer Arbeit „The phylogenetic structure of the

prokaryotic domain: The primary kingdoms“ aus dem Jahr 1977 erstmals neben Bakterien und Eukaryonten als dritte Domäne des Lebens (9). Archaeen mögen zwar mit ihren molekularen innerzellulären Abläufen Eukaryoten ähneln, unterscheiden sich aber zeitgleich im Aufbau ihrer Zellwand stark von Bakterien. In der bakteriellen Zellwand befindet sich Peptidoglykan, in derer von Archaeen nicht. Umgekehrt findet man in der archaeellen Zellwand Pseudomurein, welches in der bakteriellen Zellwand nicht vorkommt (9,11).

In Hinsicht auf ihren Stoffwechsel haben Archaeen eine große Ähnlichkeit mit Bakterien: sie können sich hetero- und autotroph, sowie organisch und lithotroph ernähren. Heterotrophe Ernährung bedeutet, dass ein Organismus seine Nährstoffe nicht selbst produzieren kann und sie über Nährstoffaufnahme zuführen muss. Dem gegenüber steht die Autotrophie, bei der ein Organismus sich selbst mit Nährstoffen versorgen kann. Lithotrophie bedeutet, dass ein Organismus sich durch Umsetzung von anorganischen Verbindungen ernähren kann (9,11). Archaeen haben aber mit Eukaryoten nicht nur hinsichtlich ihres Stoffwechsels eine Ähnlichkeit. Es ist auch erwähnenswert, dass einige Archaeenspezies als Hauptstoffwechselprodukt Methan produzieren, ein Umstand, der bei Bakterien und Pilzen nur sehr selten zu beobachten ist (9,11). Archaeen sind nicht in der Lage Sporen zu bilden, können aber durch eine enorme Reduktion ihres Wachstums, quasi durch ein Begeben in einen „steady state“, unter passenden Umweltbedingungen für Tausende von Jahren überleben (11). Hinsichtlich ihres Habitats zählen Archaeen zu den Extremophilen: manche Spezies können z.B. an Orten mit großer Hitze, in einem sauren oder basischen, sowie salzreichen Milieu überleben. Sie sind aber auch in der Tiefsee, im Frischwasser, in der Erde und auf anderen Organismen zu finden. Beim Menschen, zum Beispiel, besiedeln sie die Haut und zählen auch zur physiologischen Besiedelung des Darms (11). Bis dato wurde bei Archaeen noch kein pathologisches Potential entdeckt (11).

1.1.2.3.3 Pilze

Eine der drei Domänen des Lebens wird durch die Eukaryonten, sie zählen zu den Mehrzellern, gebildet. Zu ihnen zählen unter anderem die Pilze, welche auch als Fungi bezeichnet werden und als einzelne Zellen oder im größeren Zellverband auftreten können. Diese Lebewesen besitzen keine Möglichkeit sich fortzubewegen

(4,5). Pilze besitzen einen Zellkern, der einen teils diploiden, teils haploiden Chromosomensatz vorweist. Fungi besitzen eine starre Wand, die aus Chitin, Mannan und Glukan (ein Polysaccharid bestehend rein aus D-Glucose-Molekülen) in unterschiedlichster Zusammensetzung aufgebaut ist (4,12). Weiters kommt in ihrer Plasmamembran charakteristisch Ergosterin vor, welches als Angriffspunkt für Antimykotika dient (4,12). Im Gegensatz zu Pflanzen findet sich in der fungalen Zellwand keinerlei Zellulose wieder (4,12). Grundsätzlich können eine runde Zelle, genannt Blastospore, und eine fadenförmige, genannt Hyphe, als Grundform beschrieben werden. Hyphen wachsen durch asexuelle Fortpflanzung zu einem in sich verbundenen Geflecht heran, dem sogenannten Myzel. Es gibt eine große Fülle an Möglichkeiten Fungi einzuteilen, aber die in der Medizin geläufigste ist das sogenannte DHS-System. Die Abkürzung DHS steht für Dermatophyten, Hefe- und Schimmelpilze (4). Die genannten Punkte bezüglich der Zellwand treffen größtenteils auch auf Pflanzen zu, wobei sich Fungi in einem Merkmal ganz klar von ihnen unterscheiden: sie können keine Photosynthese betreiben. Aus diesem Grund müssen sie sich durch Kohlenstoffe heterotroph ernähren, sprich sie bauen organisches Material ab (4). In Hinsicht auf die Genetik sind Pilze enger mit Tieren und dadurch auch mit dem Menschen als mit Pflanzen verwandt (4).

Pilze sind in der Regel harmlose Umweltkeime, allerdings können einige Arten den Menschen besiedeln und pathogen auf ihn einwirken. Pathogen sind die meisten Pilze nur unter für sie besonders günstigen Bedingungen, was sie zu opportunistischen bzw. fakultativ-pathogenen Keimen macht. Dies passiert z.B. bei stark immunsupprimierten Patienten im Rahmen einer Therapie nach Organtransplantationen (4).

Pilze vermehren sich auf unterschiedliche Art und Weise asexuell und auch sexuell. Die asexuelle Vermehrung stellt die hauptsächliche Art der Fortpflanzung, welche durch Sprossung oder durch Zellteilung erfolgen kann (4).

1.1.3 Die Appendix vermiformis

1.1.3.1 Allgemeines

Die Appendix vermiformis, auch genannt Wurmfortsatz, ist ein Organ des lymphatischen Systems und entspringt aus dem Blinddarm („Caecum“). Seinen

Namen erhielt der Wurmfortsatz aufgrund seines Aussehens: er ist meist 10 cm lang und hat eine durchschnittliche Dicke von 6 mm. Durch diese Maße erscheint das Organ vermiform („wurmformig“), wodurch es seinen Namen erhielt (15,16).

1.1.3.2 Histologie

Der Wurmfortsatz weist eine für den Gastrointestinaltrakt typische Wandgliederung auf. Von außen kann man als erstes eine straffe und matt-glänzende *Tunica serosa*, kurz als Serosa bezeichnet, erkennen. Ihr innen anliegend befindet sich die *Tunica muscularis*, gefolgt von der Tunica submucosa. Im Lumen der Appendix ist die sogenannte *Tunica mucosa*, wie generell die Schleimhaut im Verdauungstrakt genannt wird, zu finden (15).

1.1.3.3 Anatomie

Seine Basis hat der Wurmfortsatz am distalen Ende des Caecums, meist knapp unterhalb der Ileocecal-Klappe, auch Bauhin-Klappe genannt. Zwischen dem Blinddarm und dem Wurmfortsatz befindet sich die sogenannte Gerlach-Klappe, welche durch eine Aufwerfung der Schleimhaut des Appendix vermiformis entsteht. Die Spitze ragt, je nach Lage, in den ventralen oder dorsalen Bauchraum (13–16).

Die Appendix hat ein eigenes Mesenterium (bei der Appendix „Mesoappendix“ genannt), eine Struktur, die die Gefäße und Nervenbahnen der Bauchorgane führen. In seiner Lage zum Blinddarm kann der Wurmfortsatz verschiedene anatomische Varianten einnehmen (13–16).

Die häufigsten Lagevarianten sind folgende:

- *deszendierend* mit ca. 30% der Fälle
- *retrocaecal ascendierend* mit ca. 65% der Fälle
- *präileal*, also vor dem distalen Dünndarmabschnitt, mit ca. 2% der Fälle
- *retroileal*, also hinter dem distalen Dünndarmabschnitt, mit ca. 1% der Fälle

Auch die Länge dieses Organs weist eine große Variabilität vor. Wie zuvor beschrieben beträgt die durchschnittliche Länge ca. 10 cm, es können aber Wurmfortsätze mit einer Länge von 2 - 20 cm beschrieben werden (15).

Die arterielle Versorgung des Blinddarms erfolgt über die *Arteria appendicularis*, welche der *Arteria ileocolica* entspringt. Den venösen Abfluss besorgt die gleichnamige *Vena appendicularis*, welche wiederum in die *Vena ileocolica* mündet (15, 16).

1.1.3.3.1 Projektion auf das äußere Abdomen

Für das Auffinden des Wurmfortsatzes am geschlossenen Abdomen wurden zwei Orientierungshilfen definiert: der *McBurney'sche* und der *Lanz'sche Punkt* (15,16). Der *McBurney'sche* Punkt befindet sich am äußeren Drittel der gedachten Linie zwischen der Spina iliaca anterior superior und dem Nabel. Er gibt Aufschluss über die Lage der Basis, sprich den Abgang des Wurmfortsatzes vom Caecum, der Appendix (15,16). Der *Lanz'sche* Punkt befindet sich am Übergang zwischen rechts-äußeren und mittleren Drittel der gedachten Linie zwischen den beiden Spinae iliaca anterior superior. Er definiert den ungefähren Ort der Spitze des Wurmfortsatzes (15,16).

1.1.3.4 Aufgaben

Der meist mit Schleim oder Darminhalt gefüllte Wurmfortsatz gehört dem GALT („gut associated lymphatic tissue“) an und zählt somit zum lymphatischen System. Lymphatisches Gewebe bildet einen wichtigen Eckpfeiler des Immunsystems. Es beherbergt Lymphozyten, also Immunzellen, die sich in diesem Gewebe durch Antigen-Kontakt weiter differenzieren und klonal vermehren (13,15,17–20).

1.2 Appendizitis

1.2.1 Definition

Als Appendizitis bezeichnet man eine akute Entzündung des Wurmfortsatzes, welche als mit Abstand häufigste Entzündung des Abdomens gilt. Man unterscheidet prinzipiell spezifische und unspezifische Entzündungen der Appendix vermiformis. Die unspezifische Appendizitis tritt weitaus häufiger als die spezifische Variante auf. Zu den spezifischen Appendizitiden zählt unter anderem die Tuberkulose (21).

1.2.2 Epidemiologie

Die akute Appendizitis gilt mit einer Inzidenz von 100 auf 100.000 Personenjahre als häufigster Notfall der Allgemeinchirurgie in Europa (21). Beim männlichen Geschlecht liegt der Häufigkeitsgipfel zwischen dem 10. und 14., beim weiblichem zwischen 15. und 19. Lebensjahr. In Ausnahmefällen wird die Appendizitis auch in der Früh-Kindheit sowie im späten Erwachsenenalter beschrieben (21). Die Wahrscheinlichkeit sich einer Appendektomie unterziehen zu müssen liegt bei Männern bei ca. 19% und bei Frauen bei ca. 23%, wobei nur ein Risiko von bei Männern 9% und bei Frauen 7% besteht jemals an einer Appendizitis zu erkranken (21). Bei komplikationslosen Verläufen liegt die Letalität in einem Bereich unter 1% (21).

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Als Ursachen für eine Appendizitis gelten in erster Linie Obturationen und anatomische Besonderheiten der Appendix vermiformis (21). Obturierende Faktoren können Koprolithen („Kotsteine“), Narben, Fremdkörper, Tumoren oder benigne Polypen darstellen. Hingegen stellt die Gerlach-Klappe, welche sich zwischen Caecum und Appendix vermiformis befindet, eine anatomische Prädilektionsstelle für das Entstehen einer Stase von Kot und somit einen Risikofaktor für eine akute Appendizitis dar (21).

Aber nicht nur die Gerlach-Klappe gilt als anatomische Voraussetzung für eine Entzündung des Wurmfortsatzes, sondern auch die arterielle Versorgung (21). Bei einer Obstruktion der Arteria appendicularis kommt es zu einer Minderversorgung

des appendiculären Gewebes mit Sauerstoff und folglich zu einer Gewebischämie (21). Die Ischämie der Appendix-Wand führt zu Wandschädigung, welche wiederum als Ausgangspunkt für eine bakterielle Infektion und daraufhin für Appendizitis gelten kann (21). Das Erregerspektrum für eine bakterielle Infektion ist sehr divers und heterogen. Zum Beispiel ist *Escherichia coli* der Hauptvertreter der Aerobier und *Bacteroides fragilis* jener der Anaerobier (21). Der Zusammenhang zwischen einer viralen Infektion und einer Appendizitis ist nicht eindeutig (22). Bei immunsupprimierten Patient*innen kommt zum Beispiel dem Cytomegalievirus (CMV) mittlerweile eine hohe Bedeutung zu (23–25). Es wurden aber bereits durch CMV bedingte Appendizitiden bei Immunkompetenten beobachtet (26). Bei Kindern zwischen dem 7. und 11. Lebensjahr sind häufig Infektionen mit dem parasitären Wurm *Enterobius vermicularis* zu beobachten, welche aber nicht selbst als Agens anzusehen sind. Sie können lediglich das Lumen der Appendix vermiformis obturieren und Symptome einer akuten Appendizitis imitieren (21).

1.2.4 Morphologie

Grundsätzlich zeigt die akute Appendizitis einen stadienhaften Verlauf, dessen einzelne Stadien fließend ineinander übergehen können.

Stadieneinteilung:

- *Primäraffekt* mit Erosionen der Schleimhaut und einem granulozytären Infiltrat
- *Phlegmonöse Appendizitis* mit einem eitrigem Exsudat in das Lumen des Wurmfortsatzes und einer deutlich erkennbaren Schwellung des Organs
- *Ulzerophlegmonöse Appendizitis* mit Ulzera an der Schleimhaut und einem phlegmonös veränderten Exsudat
- *abszedierende Appendizitis* mit einer Abszessbildung und Nekrosen bis hin zur Serosa bzw. zum Mesenteriolum
- *gangränöse Appendizitis* mit reichlich Nekrosen und einer Infektion mit Fäulnisbakterien. Die Appendix imponiert makroskopisch schwarzrot bis graugrün und weist häufig Perforationen durch eine erhöhte Fragilität der Wand auf (21).

1.2.5 Klinik

Als Eingangssymptomatik lassen sich meist Appetitlosigkeit, Unwohlsein und ein diffuser, dumpfer Bauchschmerz bereits früh erkennen. Der Schmerz richtet sich im Verlauf dann weiter Richtung McBurney-Punkt aus, kann aber auch epigastral und/oder periumbilikal auftreten. Meistens kommt es zusätzlich zu Fieber, Übelkeit und Erbrechen. Bei Kindern kann oft die Einnahme einer Schonhaltung beobachtet werden (21,27). Plötzliche Abnahme der Schmerzen und darauffolgende Flatulenzen können als Alarmzeichen für die Ruptur der Appendix vermiformis gesehen werden. Die Folge kann eine Peritonitis bedeuten (21,27).

1.2.6 Diagnostik

Primär kann zur Diagnosestellung die klassische Symptomenkombination herangezogen werden, welche durch weitere diagnostische Verfahren gesichert werden kann. Labordiagnostisch lassen sich eine Erhöhung des CRP (C-reaktives Protein) und der Leukozyten-Konzentration, sowie eine Linksverschiebung der weißen Blutkörperchen im Differentialblutbild erkennen (21). Apparativ wird in den meisten Fällen die Sonographie zu Rate gezogen, welche bei additiver Fragestellung durch eine Computertomographie (CT) bzw. eine Magnetresonanztomographie (MRT) erweitert werden kann.

Für eine bestmögliche Diagnose ohne apparative Verfahren wurden Scores entwickelt, welche zugleich als Indikator für eine möglich indizierte Operation dienen. Die bekanntesten Scores sind der Pediatric Appendicitis Score (PAS) und Alvarado-Score. Beide Scores dienen dazu, einen Anhaltspunkt bei der klinischen Diagnose einer akuten Appendizitis zu schaffen. Studien zeigten, dass sie zwar nicht als alleiniges diagnostisches Tool anzusehen sind, sondern immer in Kombination mit anderen diagnostischen Hilfsmitteln angewandt werden sollen (27,28). Kinder sind jene Bevölkerungsgruppe, bei der es am häufigsten fälschlicher Weise zu einer Appendektomie kommt (29).

1.2.6.1 Alvarado-Score

Dieser Score wurde 1986 von Alfredo Alvarado entwickelt, um bereits klinisch eine Tendenz zu eruieren, ob ein/e Patient*in sich einer Operation, sprich Appendektomie, unterziehen muss oder ob es reicht, weiter unter Beobachtung zu

bleiben, wie in Tabelle 1 ersichtlich (30). Das Ziel der Anwendung dieses Scores ist es die aufgrund fälschlich diagnostizierter Appendizitiden resultierenden Appendektomien zu minimieren. Die Patient*innen in der Originalstudie hatten ein durchschnittliches Alter von 25,2 Jahren, wobei die Spanne von 4 - 80 Jahren reichte (30). Durch den Alvarado-Score kann auch Aufschluss darüber gegeben werden, ob eine höhere oder niedrigere Wahrscheinlichkeit für eine akute Appendizitis vorliegt (31).

Tabelle 1: Alvarado-Score

<i>Symptom</i>	<i>Score</i>
Schmerzwanderung	1
Appetitlosigkeit	1
Nausea/Emesis	1
Empfindlichkeit im rechten unteren Quadranten	2
Loslassschmerz	1
erhöhte Körperkerntemperatur	1
Leukozytose	2
Linksverschiebung des weißen Blutbildes	1
Summe	10

Die Interpretation des Alvarado-Scores ergibt sich aus der Summe der Werte der einzelnen Symptome. In Tabelle 2 wird die Interpretation des errechneten Scores veranschaulicht.

Tabelle 2: Interpretation Alvarado-Score übernommen aus (26)

<i>Score</i>	<i>Wahrscheinlichkeit einer akuten Appendizitis</i>	<i>therapeutisches Vorgehen</i>
1 - 4	sehr unwahrscheinlich	Beobachtung
5 - 6	wahrscheinlich	Beobachtung und regelmäßige Evaluierung
7 - 8	sehr wahrscheinlich	Operation
9 - 10	definitiv	Operation

Obwohl der Alvarado-Score als sehr sensitiv und spezifisch gilt, sollte zusätzlich zur klinischen Evaluierung auch ein bildgebendes Verfahren, wie z.B. die Sonographie, Anwendung zur Sicherung der Diagnose herangezogen werden (28).

1.2.6.2 Pediatric Appendicitis Score (PAS)

Auch der Pediatric Appendicitis Score, ersichtlich in Tabelle 3 (32), ist ein Hilfsmittel zur Evaluierung einer Möglichkeit der akuten Appendizitis, bezieht sich aber im Gegensatz zum Alvarado-Score explizit auf Kinder im Alter von 4 - 15 Jahren (32).

Tabelle 3: Pediatric Appendicitis Score (PAS)

<i>Symptom</i>	<i>Score</i>
Druckempfindlichkeit/Schmerzen beim Husten	2
Appetitlosigkeit	1
Fieber	1
Nausea/Emesis	1
Empfindlichkeit im rechten unteren Quadranten	2
Leukozytose	1
polymorphonukleäre Neutrophilie	1
Schmerzwanderung	1
Summe	10

Der PAS geht auf die Besonderheiten in der Pädiatrie ein und bildet somit einen sehr sensitiven und spezifischen Score, der in der Diagnostik der Appendizitis und der Verminderung der „Fehl-Appendektomien“ dienlich ist (32). Wie auch bei der Verwendung des Alvarado-Scores sollten auch beim Einsatz des PAS zusätzliche diagnostische Verfahren, wie eben die Bildgebung mittels Sonographie, verwendet werden (28). Tabelle 4 gibt Aufschluss darüber, wie die Schwere der Inflammation der Appendix bzw. das Patient*innenalter mit dem PAS zusammenhängt (32).

Tabelle 4: Alter und PAS (Mittelwert und Standardabweichung (SD) von Patient*innen mit verschiedenen Stadien bei Appendizitis und ohne Appendizitis

<i>Appendizitis</i>	<i>Alter</i>	<i>PAS</i>
Entzündlich (n = 256)	9.7 ± 2.9	8.9 ± 0.5
Eitrig (n = 265)	10.8 ± 3.4	8.9 ± 0.5
Gangränös (n = 68)	6.7 ± 2.7	9.6 ± 0.1
Perforiert (n = 145)	10.5 ± 3.2	9.5 ± 0.1
Gruppe 1: alle Fälle der Appendizitis (n = 734)	9.9 ± 3.3	9.1 ± 0.1
Gruppe 2: keine Appendizitis (n = 436)	11 ± 2.7	3.1 ± 1.1

1.2.7 Differentialdiagnosen

Akute Abdominal-Schmerzen könnten in ihren Ursachen nicht mannigfaltiger sein. Für eine Differentialdiagnose zur akuten Appendizitis kommt deswegen eine Vielzahl an möglichen Ursachen in Frage.

1.2.7.1 Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes

Alle möglichen Erkrankungen des Darmes können eine Appendizitis imitieren. Meckel-Divertikel, infektiöse Kolitiden, Divertikulitis und Ischämie, sind nur einige Erkrankungen, die zu nennen sind, um einen Einblick in die Fülle der Darm-assoziierten Differentialdiagnosen der Appendizitis zu bekommen (21,28,29). Weiters sind noch die Wurmfortsatz-spezifischen Erkrankungen wie die chronisch-rezidivierende Appendizitis, die neurogene Appendikopathie, Mukozele oder maligne Tumoren der Appendix zu nennen. Eine chronisch-rezidivierende Appendizitis unterscheidet sich von ihrer akuten Form lediglich durch den zeitlichen Verlauf. Sie tritt immer wieder auf und zeigt histologisch im nicht-entzündlichen Stadium eine Fibrose der Appendixwand auf, was ein Indiz für durchlebte Entzündungen ist (21,28,29). Die neurogene Appendikopathie entsteht aufgrund einer Proliferation nervaler Strukturen der Appendixwand und ist rein klinisch sehr schwer von einer akuten Appendizitis zu differenzieren (21,28,29).

1.2.7.2 Erkrankungen der weiblichen Geschlechtsorgane

Die weiblichen Geschlechtsorgane halten eine weitere Quelle für Differentialdiagnosen bereit, die bei einer Appendizitis-Symptomatik bedacht werden sollten. Allen voran steht die Adnexitis, also die Entzündung der Tuben und Ovarien (21,28,29).

1.2.7.3 Erkrankungen des Urogenitaltraktes

Auch im Urogenitaltrakt liegt ein differentialdiagnostisches Potential, welches nicht zu unterschätzen ist. Die häufigsten Differentialdiagnosen zur akuten Appendizitis sind Harnwegsinfekte aller Art, die Hodentorsion, Epidymitis und die Urolithiasis (21,33,34).

1.3 Appendizitis und Mikrobiom

1.4 Therapie der akuten Appendizitis

1.4.1 Allgemein

Das therapeutische Mittel der Wahl bei einer akuten Appendizitis ist grundsätzlich nach wie vor die Appendektomie. Bei dieser wird entweder offen-chirurgisch oder laparoskopisch die Appendix vermiformis aufgesucht, freipräpariert, mobilisiert und ektomiert.

Mittlerweile wird die Notwendigkeit des chirurgischen Vorgehens a priori diskutiert, da der Wurmfortsatz einen Teil des lymphatischen Systems darstellt und dessen Entfernung ein eingebüßtes lymphatisches Organ bedeutet (27).

1.4.2 Laparoskopische Appendektomie

Als Laparoskopie bezeichnet man diagnostische oder operative Verfahren, bei denen über sogenannte Ports Werkzeuge in das Abdomen eingebracht werden. Im Gegensatz zur offenen Laparotomie sind bei der Laparoskopie nur kleine Hautschnitte von Nöten, die ein kosmetisch ansprechenderes Ergebnis und generell schonenderes Verfahren mit einer geringeren Schmerzintensität darstellen (27,35). Die laparoskopische Appendektomie stellt die mit Abstand am häufigsten durchgeführte minimalinvasive Operation im Kindesalter dar und wird bei Lernenden als Einstiegsoperation für die Laparoskopie angesehen (27).

Bei der laparoskopischen Appendektomie werden in der Regel drei Ports benötigt, die durch einen kleinen Hautschnitt mit anschließender Aufdehnung durch einen Trokar erzeugt werden (27). Grundsätzlich wird ein Port für die videoassistierte Optik und zwei weitere für die Instrumente werden benötigt. Die Instrumenten-Trokare werden zu Beginn der Operation an geeigneten Stellen des Abdomens platziert, dies geschieht meist am McBurney'schen Punkt und im linken unteren Abdominalquadranten. Ihr Durchmesser beträgt in der Regel 3 bzw. 5 mm. Der Port für das Laparoskop befindet sich meist im Bereich des Bauchnabels und weist einen Durchmesser von 10 mm auf. Über ihn wird im Anschluss auch die abgetrennte Appendix geborgen (27). Durch die eingebrachten Instrumente kann somit die Appendektomie durchgeführt werden. Bevor dies geschieht muss unbedingt eine

Inspektion der Appendix und der umliegenden Strukturen geschehen. Es besteht nämlich die Möglichkeit der Perforation oder dass die Appendix vermiformis keine makroskopischen Zeichen einer Entzündung vorweist. Ist dies der Fall, wird die Laparoskopie zur Diagnostik eines möglichen anderen entzündlich-veränderten Organs herangezogen (27).

1.4.3 Offene Appendektomie

Bei der offenen Appendektomie, auch als konventionelle bezeichnet, setzt der/die Operateur*in entweder einen sogenannten *Pararektal-* oder einen *Wechselschnitt* (27). Der *Pararektalschnitt* wird als Hautschnitt in Sagittalebene rechts pararektal, also neben dem Musculus rectus abdominis, begonnen. Daraufhin wird bis zum vorderen Blatt der Rektus-Scheide präpariert, welche dann eröffnet wird. Als nächster Schritt wird der Musculus rectus abdominis beiseitegeschoben was eine Darstellung der hinteren Rektus-Scheide ermöglicht. Diese wird zusammen mit dem Peritoneum durchtrennt und es wird folglich der Zugang in das Abdomen ermöglicht (27). Beim folgenden Arbeitsschritt wird das Caecum aufgesucht, die Appendix vermiformis mobilisiert, ligiert und ektomiert. Im Anschluss kann eine schichtweise Naht mit abschließender Hautnaht durchgeführt werden. Beim *Wechselschnitt* erfolgt ein querer Hautschnitt nächst dem McBurney'schen Punkt. Ähnlich wie beim Pararektalschnitt wird die Aponeurose der Musculi obliqui abdominis internus et transversus durchgeführt und die Muskeln anschließend stumpf zur Seite geschoben. Die restliche Operation erfolgt gleich wie bei der Variante mit Pararektalschnitt (27,35,36).

Der Vorteil der offenen Appendektomie ist die Möglichkeit der besseren Übersicht und des größeren Handlungsumfangs bei einer eventuell perforierten Appendizitis. Als nachteilig werden die größere Narbe, die mehr Spielraum für Dehiszenzen bildet, und höhere Schmerzintensität gesehen (27,35,36).

1.4.4 Konservative Therapie der Appendizitis

Eingangs schon erwähnt ist die Appendix vermiformis Teil des lymphatischen Systems. Die Überlegung dieses Organ auch bei einer akuten Inflammation zu erhalten wird seit einiger Zeit angestellt. Grundsätzlich muss für eine konservative

Therapie der Appendizitis die Appendixwand intakt sein und es dürfe keinerlei Hinweise auf eine akute Peritonitis bestehen (27,37).

Die Therapie gestaltet sich dann durchaus basal: parenterale Flüssigkeitszufuhr, Analgesie, Nahrungskarenz, Bettruhe und i.v.-Antibiose.

Studien an erwachsenen Patient*innen haben gezeigt, dass 73% aller Appendizitiden bei Erwachsenen keinerlei chirurgische Intervention bedürfen. Gesicherte Daten für das Kindesalter existieren derzeit noch nicht (27,37).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Studie war die Beschreibung des Mikrobioms, Archaeoms und Mykobioms der Appendix vermiformis im Rahmen der akuten Appendizitis bei Patient*innen im Kindes- bzw. Jugendalter. Das Hauptaugenmerk lag auf der Detektion von potentiell aggressiven und protektiven Mikroorganismen, woraus sich möglicherweise neue Ansätze für eine gezielte konservative Therapie der Entzündungsquelle, wie z.B. durch eine Antibiose, ergeben könnten. Dadurch könnte den Patient*innen ein bereits im Kindes- und Jugendalter stattfindender operativer Eingriff, welcher aufgrund vieler Aspekte immer ein gewisses Risiko darstellt, erspart werden. Um unser Ziel zu erreichen analysierten wir die Abundanz von bakteriellen, archaeellen und fungalen Taxa hinsichtlich des histologischen Schweregrades, des Alvarado-Scores und der Höhe des CRP. Diese Parameter wurden von uns repräsentativ für den Schweregrad der Entzündung und die symptomatischen Auswirkungen auf unsere Patient*innen gewählt.

2 Materialien und Methoden

Um das definierte Ziel der Studie zu verfolgen wurden im Ausmaß von akut indizierten Appendektomien an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie von 60 Patient*innen, im Alter von 3 bis 17 Jahren, intraoperativ Appendix-Proben entnommen. Anschließend daran wurde die DNA extrahiert. Bakterielle, archaeelle und fungale Markergene wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) amplifiziert und das daraus gewonnene Material wurde danach durch Sequenzierung auf dessen mikrobiologische Zusammensetzung analysiert.

Alle Schritte der DNA-Extraktion, der PCR und der anschließenden Sequenzierung wurden in den Labors des Zentrums für Medizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

2.1 Patient*innen-Kohorte

In unsere Studie wurden insgesamt 60 Patient*innen der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie eingeschlossen, die an einer akuten Appendizitis erkrankt waren und dadurch einer Appendektomie zugeführt werden mussten. Alle Patient*innen befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Kindes- bzw. Jugendalter (3-17 Jahre). Die Geschlechterverteilung lag bei 42 männlichen und 18 weiblichen Patient*innen. Die erhobenen klinischen Parameter der Metadaten befinden sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Erhobene Parameter der Metadaten

Parameter		Anzahl (n)
<i>Patienten-ID</i>	1 – 60	
<i>Geschlecht</i>	männlich	42
	weiblich	18
<i>Antibiose vor der OP</i>	1 = ja	20
	2 = nein	40
<i>Schweregrad</i>	1 = subakut	4
	2 = akut	14
	3 = phlegmonös	31
	4 = gangränös	3
	5 = perforiert	8

Parameter		Anzahl (n)/Höhe
<i>Alter bei der OP</i>	jüngste*r	3
	älteste*r	17
	Mittelwert ± SD	11 ± 3,5
<i>PAS</i>	niedrigster	3
	höchster	10
	Mittelwert ± SD	6,95 ± 2,23
<i>Alvarado-Score</i>	niedrigster	3
	höchster	10
	Mittelwert ± SD	6,9 ± 2,32
<i>Leukozyten [10⁹/L]</i>	niedrigster	5,17
	höchster	28,82
	Mittelwert ± SD	14,03 ± 5,29
<i>CRP [mg/L]</i>	niedrigster	0
	höchster	354,2
	Mittelwert ± SD	48,65 ± 56,55

Um den Schweregrad („severity“) der Appendizitis der einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, wurde die Einteilung des Schweregrades für die weiterführende Analyse mit LEfSe (linear discriminant analysis effect size) in „high“ (severity > 4), „medium“ (severity = 3) und „low“ (severity < 3) gegliedert.

Tabelle 6: Einteilung der Metadaten

	Einteilung	Höhe	Anzahl der Proben
<i>Alvarado-Score Rating</i>	low	0 – 4	10
	intermediate	5 – 6	12
	high	7 – 10	38
<i>CRP Rating</i>	normal	≤ 5	12
	increased	≤ 40	27
	high	> 40	21
<i>Schweregrad Rating</i>	low	1 – 2	18
	medium	3	31
	high	4 – 5	11

2.2 Proben

Die zu untersuchenden Proben wurden aus der Basis, sprich aus dem proximalsten Anteil, der Appendix vermiformis gewonnen. Dazu schnitten die operierenden Chirurg*innen ein ca. 1 cm großes Stück der Basis ab und überführten dieses in ein 5 mL fassendes Eppendorf-Gefäß und stellten dieses anschließend bei -20°C im OP-Bereich der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie zur Präservierung kalt. Anschließend daran wurden die Appendixstücke am Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) bei -80°C bis zur weiteren Prozessierung tiefgefroren. Die restlichen Anteile der Appendix wurden der Standard-Histologie zugeführt, um den histologischen Schweregrad der akuten Appendizitis festzustellen.

2.3 Ethische Überlegungen

Aufgrund des Alters wurden hinsichtlich der Zustimmung zwei unterschiedliche modi operandi gewählt. Für Kinder unter 14 Jahren bedurfte es der Zustimmung der Eltern zur Teilnahme an der Studie, da die österreichische Gesetzgebung eine Mündigkeit erst bei Minderjährigen ab dem vollendeten 14. Lebensjahr feststellt (38). Bei Patient*innen zwischen 14. und 18. Lebensjahr lag die Entscheidung, ob sie an der Studie teilnehmen wollten, bei ihnen selbst. Die gesamte Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz (EK Nummer: 31-004 ex 18/19) bewilligt.

2.4 Auswahl einer geeigneten Methode zur DNA-Extraktion

Da unseres Wissens in der Literatur noch keine DNA-Extraktion aus dem Archaeom der Appendix vermiformis beschrieben wurde, haben wir eine geeignete Methodik vorerst an äquivalenten Proben etabliert. Für dieses Unterfangen wurden Testproben gesammelt, welche humanen Präparaten genetisch und auch in Ihrer Gewebskonstellation sehr ähnlich sind. Aufgrund der genetischen Nähe sowie auch der Verfügbarkeit fiel die Entscheidung auf Blinddarmpräparate vom Schwein (39–45). Hierzu wurden Blinddärme von unmittelbar zuvor geschlachteten Schweinen mittels sterilen Equipments direkt im Schlachthof entnommen, in Probenröhrchen gesammelt und anschließend auf Trockeneis gestellt. Die Proben wurden daraufhin umgehend ohne Unterbrechung der Kühlkette ins Labor am Zentrum für Medizinische Forschung gebracht und ebendort bei -20°C bis zur weiteren Prozessierung gelagert. Für die weitere Prozessierung wurden 3 Schweineblinddärme zerkleinert, wobei auf eine nahtlose Kühlung der Proben geachtet wurde. Hierzu wurden zunächst Metall-Racks mittels Trockeneis gekühlt und Petri-Schalen darauf platziert. In diesen Petrischalen wurde aus den Proben mittels sterilen Einmalskalpellen jeweils Stücke mit ca. 25 mg gewonnen. Dabei wurde der gesamte Querschnitt des Schweineblinddarms erfasst, wie es auch für die humanen Präparate vorgesehen war. Nach jeder einzelnen Probenentnahme wurde die kontaminierte Petrischale verworfen und eine neue verwendet, gleiches galt für das Skalpell. Die gewonnenen Stücke wurden jeweils in Bead-Beating-Röhrchen (Lysing Matrix E, MP Biomedicals) oder Sammelröhrchen gesammelt und umgehend mittels flüssigem Stickstoff gefroren. Die gewonnenen Proben wurden

anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die genauen Bezeichnungen der Proben und deren Gewicht können nachfolgend in den Tabellen 7 und 8 gefunden werden.

Tabelle 7: Bezeichnungen der Schweine-Proben (Bead-Beating-Röhrchen) und ihr Gewicht (in Gramm); Monarch® Genomic DNA Purification Kit (M), E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (St), DNeasy® PowerSoil® Kit (So), XS-Puffer (X)

Nummer	Gewicht (leer)	Gewicht (voll)	Gewicht (Probe)
1 M	2,5705	2,6022	0,0317
1 St	2,5941	2,6214	0,0273
1 So	2,5831	2,6140	0,0309
1 X	2,5821	2,6065	0,0244
2 M	2,6247	2,6550	0,0303
2 St	2,6059	2,6224	0,0165
2 So	2,5566	2,5790	0,0224
2 X	2,5925	2,6149	0,0224
3 M	2,6246	2,6528	0,0282
3 St	2,5731	2,6058	0,0327
3 So	2,6186	2,6400	0,0214
3 X	2,6025	2,6355	0,0330

Tabelle 8: Bezeichnungen der Schweine-Proben (Sammelröhrchen) und ihr Gewicht (in Gramm); Monarch® Genomic DNA Purification Kit (M), E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (St), DNeasy® PowerSoil® Kit (So), XS-Puffer (X)

Nummer	Gewicht (leer)	Gewicht (voll)	Gewicht (Probe)
1 M	1,0009	1,0392	0,0383
1 St	1,0012	1,0303	0,0291
1 So	1,0043	1,0284	0,0241
1 X	1,0048	1,0175	0,0127
1 En	1,0061	1,0255	0,0194
2 M	1,0012	1,0284	0,0272
2 St	1,0011	1,0213	0,0202
2 So	1,0010	1,0272	0,0262
2 X	1,0018	1,0173	0,0155
2 En	0,9985	1,0115	0,0130
3 M	1,0047	1,1398	0,1351
3 St	1,0013	1,1035	0,1022
3 So	1,0111	1,0429	0,0318
3 X	0,9980	1,0280	0,0300
3En	1,0032	1,0380	0,0348

2.4.1 Die Erprobung der einzelnen Verfahren

2.4.1.1 XS-Puffer-Extraktion (XSB-Extraction)

Bei der XSB-Extraktion wurden jene Proben herangezogen, welche in Tabelle 7 und Tabelle 8 mit einem „X“ gekennzeichnet wurden. Für die Durchführung der XS-Puffer-Extraktion wurden folgende Substanzen in der dazugehörigen Menge in einem Falcon-Behälter benötigt:

Tabelle 9: Benötigte Chemikalien für den XS-Puffer (XSB)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
1 M Tris/HCl, pH 7,4	4,00 mL
7 M Ammoniumacetat	4,56 g
250 mM Na ²⁺ EDTA	3,20 mL
10% SDS	4,00 mL
Kaliummethylxanthogenat	0,40 g
H ₂ O (LiChrosolve®)	4,99 mL

Tabelle 10: Benötigte Geräte für die Probenextraktion mit XS-Puffer (XSB)

<i>Bezeichnung</i>	<i>Gerätetyp</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Land</i>
Combi-Spin FVL2400N	Vortex-Mischer	Biosan	LVA
MagNA Lyser®	Lyse-Zentrifuge	Roche Diagnostics	CHE
Centrifuge 5427R	Kühlzentrifuge	Eppendorf	GER
TS-100C	Thermoshaker	Biosan	LVA
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Fluorometer	Thermo-Fischer	GER

Die XSB-Extraktion wurde gemäß dem etablierten Protokoll, welches im Anhang unter Punkt 6.1.1 zu finden ist, durchgeführt.

2.4.1.2 E.Z.N.A.® Stool DNA Kit

Der E.Z.N.A.® Stool DNA Kit wurde für jene Testproben vom Schwein angewandt, welche in Tabelle 7 und Tabelle 8 mit „St“ gekennzeichnet wurden. Der Kit wurde wie vom Hersteller angegeben, bis auf folgende Ausnahmen, durchgeführt:

- Es wurden 540 µL SLX-Plus Puffer in die gekühlten Bead-Beating-Röhrchen pipettiert und das Bead-Beating wurde mittels MagNA Lyser® 2 x für 30 s bei 6500 rpm durchgeführt. Die Proben wurden zwischen den Durchgängen gekühlt.
- Bei Schritt 3 wurde für Gram-positive Bakterien zusätzlich erwärmt.
- Die Elution erfolgte mit 100 µL Elutionspuffer.

Tabelle 11: E.Z.N.A.® Stool Kit für die DNA-Extraktion

<i>Kit-Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Land</i>
E.Z.N.A.® Stool DNA Kit	Omega Bio-Tek	USA

Die Extraktion mit dem verwendeten Kit wurde gemäß des etablierten Protokolls durchgeführt, welches im Anhang unter Punkt 6.1.2 zu finden ist.

2.4.1.3 DNeasy® PowerSoil® Kit

Das DNeasy® PowerSoil® Kit wurde für die Testproben vom Schwein angewandt, die in Tabelle 7 und Tabelle 8 mit „So“ gekennzeichnet wurden. Die Extraktion wurde wie vom Hersteller empfohlen, bis auf folgende Ausnahmen durchgeführt:

- Die C1-Lösung wurde umgehend in die im Kit mitgelieferten Power-Bead-Tubes (DNase- und RNase-frei; Keramik-, Glas-, Metall- und Granat-Beads) nach dem Übertragen der tiefgefrorenen Probe pipettiert.
- Zur Elution wurde LiChrosolve® PCR-Wasser verwendet.
- Für das Bead-Beating der Proben wurde ein MagNA Lyser® (2 x 30 min, 6500 rpm) verwendet. Die Proben wurden zwischen den Durchgängen gekühlt.

Tabelle 12: PowerSoil® Kit für die Probenextraktion

<i>Kit-Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Land</i>
DNeasy® PowerSoil® Kit	Qiagen®	NED

Tabelle 13: Benötigte Geräte für die Probenextraktion mit dem PowerSoil® Kit

<i>Bezeichnung</i>	<i>Gerätetyp</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Land</i>
MagNA Lyser®	Lysezentrifuge	Roche Diagnostics	CHE

Die Extraktion mit dem verwendeten Kit wurde gemäß des etablierten Protokolls durchgeführt, welches im Anhang unter Punkt 6.1.3 zu finden ist.

2.4.1.4 Monarch® Genomic DNA Purification Kit

Es wurden beim Test des Monarch® Genomic Purification Kit die Testproben vom Schwein verwendet, welche in Tabelle 7 und Tabelle 8 mit einem „M“ gekennzeichnet wurden. Der Kit stellt dem/der Anwender*in frei, ob für die weitere Prozessierung PBS (phosphate buffered saline) oder 10 mM Tris-HCl-Lösung verwendet wird. Wir entschieden uns für die Tris-HCl-Lösung, welche frisch für die Verwendung hergestellt wurde. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde bis auf folgende Abänderungen eingehalten:

- ad Punkt 1: Wurde übersprungen, da eine feste Probe verwendet wurde.
- ad Punkt 2: für die Proben M-HC wurden 100 µL Lysozym und 100 µL Lyse-Puffer verwendet.
- ad Punkt 3: Hier wurde ebenfalls für die Proben M-HC 100 µL Lysozym und 100 µL Lyse-Puffer verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1 h.

- ad Punkt 4: Inkubation für 3 h bei 500 rpm im Thermocycler. Für die M-HC-Proben wurden 15 µL Proteinase-K verwendet.

- ad Punkt 5: Inkubation für 10 min.

Protokoll für DNA-Bindung und Elution:

- ad Punkt 6: 50 µL Elutionspuffer wurden verwendet.

Tabelle 14: Monarch® Kit für die Probenextraktion

<i>Kit-Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Land</i>
Monarch® Genomic DNA Purification Kit	New England Biolabs® Inc.	USA

Die Extraktion mit dem verwendeten Kit wurde gemäß des etablierten Protokolls durchgeführt, welches im Anhang unter Punkt 6.1.4 zu finden ist.

2.5 DNA-Extraktion aus menschlichen Appendixproben

2.5.1 Verarbeitung der Proben vor der Extraktion

Für die Extraktion bakterieller, archaeeller und fungaler DNA aus unseren Proben musste, wie bei den Schweineproben, zunächst ein Stück in geeigneter Größe aus den Proben gewonnen werden. Wie in Punkt 2.4 beschrieben, wurden Stücke von ~25 mg entnommen, die einem Querschnitt der Appendix entsprechen (siehe Abbildung 2).

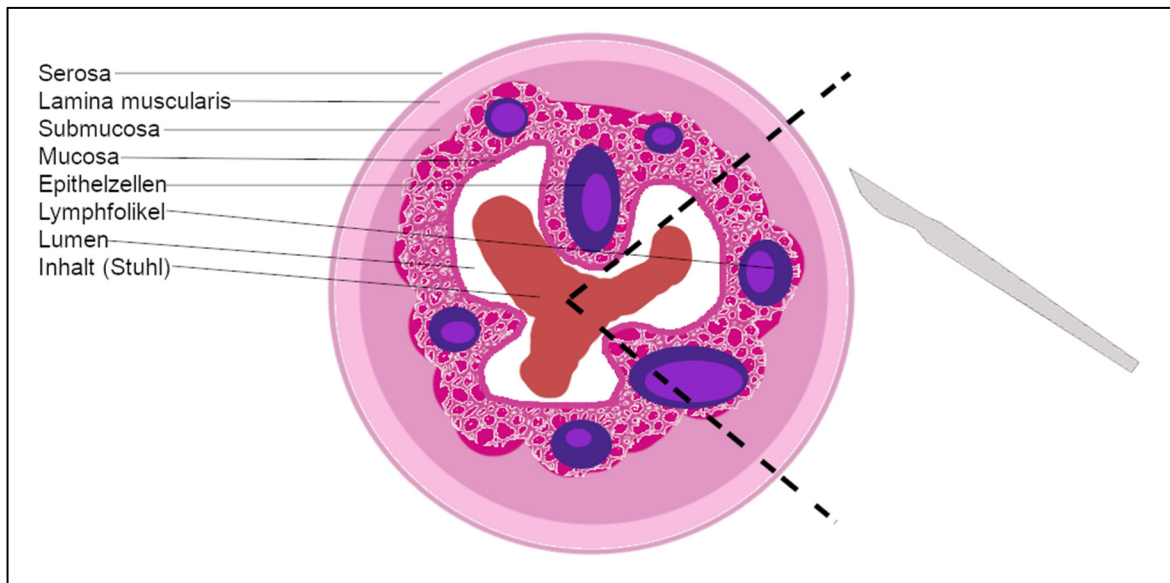


Abbildung 2: Schema Exzision der Probe aus der Appendix mit einem sterilen Einmalskalpell. Die Appendix vermiformis mit ihren Schichten in schematischer Darstellung angelehnt an die Darstellung im Taschenatlas der Anatomie, Band 2: Innere Organe von Fritsch und Kühnel (46).

Aus jeder Probe wurden zwei Gewebeteile mit ca. 25 mg Gewicht entnommen und in jeweils ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß und in ein Power-Bead-Gefäß transferiert. Auch während dem Schneiden wurde strikt auf ausreichende Kühlung der Proben geachtet: auf in Trockeneis gekühlte Metall-Racks wurden in Petrischalen Gewebestücke aus den Appendixproben per Skalpell exzidiert. Die in den Eppendorf- bzw. Power-Bead-Gefäße befindlichen Gewebeteile wurden nach dem Schneidevorgang umgehend bis zur weiteren Verwendung in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei -80°C aufbewahrt. Die übrigen Appendix-Anteile wurden bei -20°C für eine eventuelle Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.5.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion und deren Qualitätskontrolle wurde von Marcus Blohs, MSc nach dem für den verwendeten Kit geltende Protokoll durchgeführt. Aus den zu je ca. 25 mg schweren Gewebestücken der Appendizes wurde mittels DNeasy® PowerSoil® Kit nach den Vorgaben des unter Punkt 2.4.1.3. bereits beschriebenen Protokolls mikrobielle DNA extrahiert. Bevor endgültig mit der Extraktion begonnen werden konnte, musste noch das Gewicht der zu prozessierenden Gewebestücke ermittelt werden. Die genaue Auflistung der einzelnen Gewichte der PowerBead® Tubes (ungefüllt/gefüllt/Differenz) kann in Tabelle 22 im Anhang eingesehen werden. Anschließend wurde die hergestellte Lösung des DNeasy PowerSoil Kit® in der empfohlenen Menge in die Power-Bead-Tubes pipettiert und dem Bead-Beating zugeführt. Hierzu wurde ein MagNA Lyser® verwendet und zwei Rotationszyklen zu je 30 Minuten bei 6500 rpm durchgeführt. Nach dem Bead-Beating wurden dem Gemisch noch 60 µL Verdünnungspuffer, im Kit als C1-Lösung bezeichnet, beigemischt. Die Qualität und Quantität wurde anschließend mittels Elektrophorese auf Agarose-Gel beurteilt. Das Resultat zeigte, dass der Großteil der DNA-Fragmente größer als 1,5 kb (Kilobasen) und kleiner als 10 kb waren.

2.5.3 NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit

Die Besonderheit dieses Kits ist, dass die menschliche DNA gebunden und entfernt werden kann. Durch diesen Vorgang wird die mikrobielle DNA der Proben angereichert (47). Die verwendeten Proben wurden, wie in der Tabelle 7 und Tabelle 8 ersichtlich, mit „En“ gekennzeichnet. Das NEBNext® Microbiome DNA Enrichment Kit wurde, bis auf wenige Punkte, wie vom Hersteller empfohlen, verwendet:

- ad Punkt 3: Es wurden für alle Proben 1 µL Protein und 16 µL Beads verwendet.

Protokoll für das Ausfällen mit Ethanol

- ad Punkt 2: Die Probe wurde über Nacht getrocknet und am nächsten Tag mit 10 µL Tris-EDTA-Puffer auf einem Thermoshaker (37°C, 30 min, 300 rpm) resuspendiert.

Tabelle 15: NEBNext® Enrichment Kit für die Anreicherung der Proben

<i>Kit-Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Land</i>
NEBNext® Microbime DNA Enrichment Kit	New England Biolabs® Inc.	USA

Die Extraktion mit dem verwendeten Kit wurde gemäß dem etablierten Protokoll durchgeführt, welches im Anhang unter Punkt 6.1.5 zu finden ist.

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Nach der DNA-Extraktion wurden die Proben für die DNA-Amplifikation vorbereitet. Hierzu wurden das 16S rRNA Gen von Bakterien, Archaeen und die ITS-Region (Internal Transcribed Spacer) der Fungi mittels PCR amplifiziert. Hierbei musste man die einzelnen Domänen in der Durchführung der PCR unterscheiden: für Bakterien und Pilze wurde eine einfache PCR angewandt, für die Archaeen hingegen eine sogenannte „nested PCR“. Dieses Verfahren wurde für die Archaeen gewählt, weil es für Archaeen eine viel spezifischere Methode darstellt als eine reguläre PCR. Bei der „nested PCR“ werden zwei PCR-Durchgänge mit jeweils einem eigenen Forward- bzw. Reverse-Primer pro Durchgang durchgeführt. Das Produkt der ersten PCR dient als Ausgangsmaterial für die zweite PCR, was zu einer Steigerung der Spezifität führt.

Tabelle 16: Materialien für die PCR von bakteriellem Genom

Chemikalien		
<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Land</i>
10 X Ex Taq Buffer®	Takara Bio Inc.	JAP
dNTP-Mix	Takara Bio Inc.	JAP
Ex-Taq® DNA Polymerase	Takara Bio Inc.	JAP
PCR-Wasser	Life Technologies	USA
Primer		
<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	
Foward-Primer Illu-515F	CAGCMGCCGCGGTAA	
Reverse-Primer Illu-806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT	
Geräte		
<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Land</i>
PCR-Cycler T100	Bio Rad	USA

Tabelle 17: Herstellungsblatt für die PCR von bakteriellem Genom

Bakterien: PCR					
PCR-Master-Mix			Thermocycler-Programm		
Bezeichnung	Konz.	Vol. [μ L]	T[$^{\circ}$ C]	t	Zyklen
10x Ex Taq Buffer [®]	10 X	140,80	94	3 min	1 x
Foward-Primer Illu-515F	10 μ M	28,16	94	45 s	35 x
Reverse-Primer Illu-806R	10 μ M	28,16	50	60 s	
dNTP-Mix	2,5 mM	112,64	72	90 s	
Water	-	1372,80	72	10 min	
Bakterien-Template	-	1,00			
Ex-Taq [®] DNA Polymerase	5 U/ μ L	7,04	4	∞	1 x
Gesamt		1689,60			
Volumen pro Tube		24,00			

2.7 Elektrophoretische Überprüfung der PCR-Produkte

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese der bakteriellen, archaeellen und fungalen DNA-Fragmente wurden 20 mL von 3%-Agarose-Gel mit 2 μ L ROTI[®]GelStain Färbereagenz hergestellt. Anschließend wurde das flüssige Gel in eine 20 mL Form zum Aushärten gefüllt. Daraufhin wurden 3 μ L der PCR-Produkte, sprich der bakteriellen bzw. archaeellen DNA-Fragmente, jeweils mit 1 μ L DNA-Loading-Puffer vermischt und in Kammern am Gel aufgetragen. Die Kammer wurde mit TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA) befüllt, bis der Flüssigkeitsspiegel \sim 1 cm betrug. Um die Länge der einzelnen Banden genau eruieren zu können, wurden noch 2 μ L FastRuler Low Range DNA Ladder in 3 Kammern des Gels aufgetragen. Jedes einzelne Gel wurde dann für 40 min bei 70 Volt und 400 mA einer Elektrophorese unterzogen. Die Elektrophorese wurde in Zusammenarbeit mit Marcus Blohs, MSc durchgeführt.

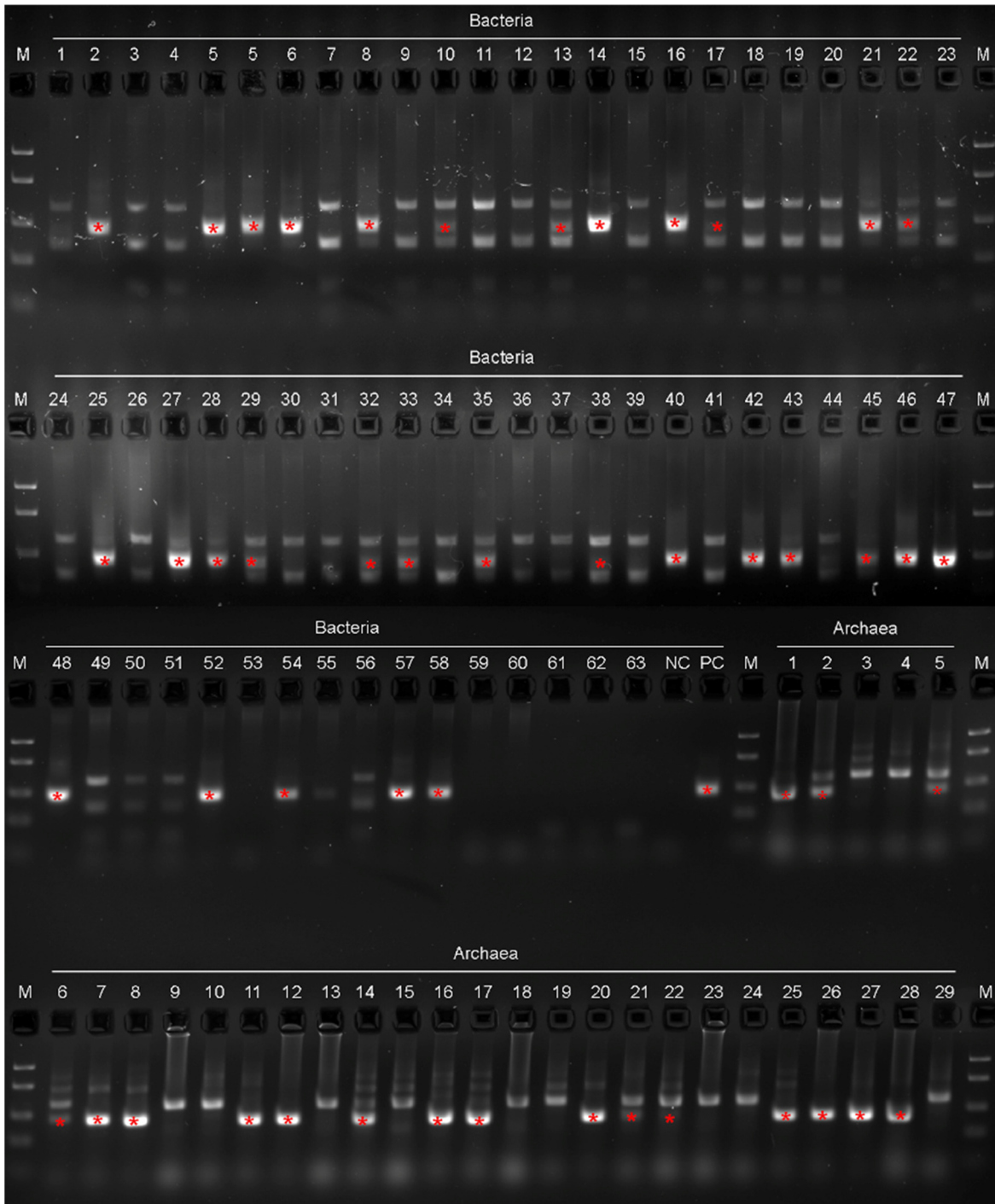


Abbildung 3: Gelbanden der Elektrophorese; Mit dem roten "*" gekennzeichnete Banden signalisieren bakterielle bzw. archaeelle DNA mit der erwarteten Bandlänge. Mit „PC“ bezeichnete Banden sind Positivkontrollen, mit „NC“ bezeichnete Negativkontrollen. Die mit „M“ bezeichneten Taschen wurden mit dem FastRuler Low Range DNA Ladder® (Thermo Scientific) befüllt.

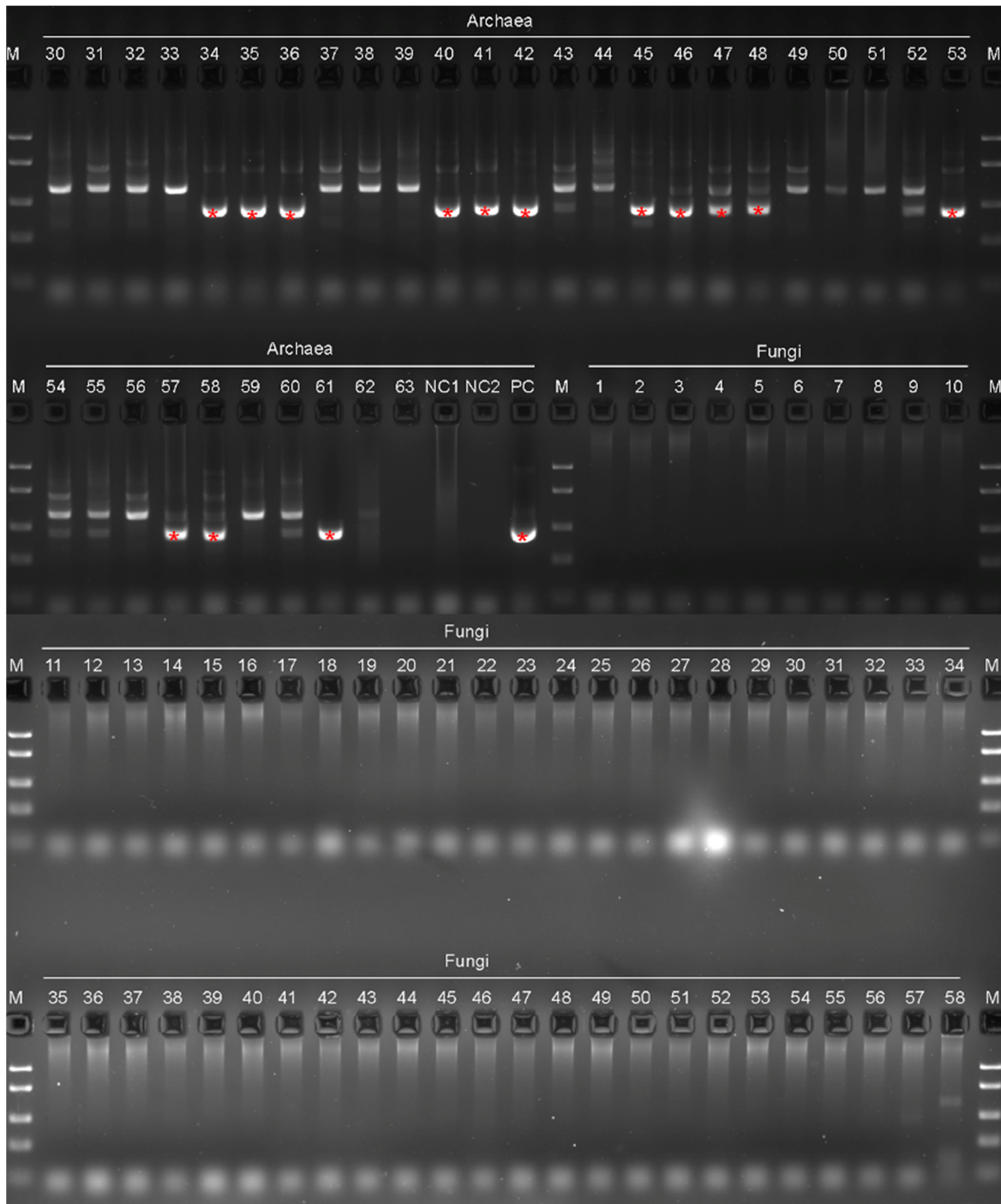


Abbildung 4: Gelbanden der Elektrophorese; Mit dem roten "*" gekennzeichnete Banden signalisieren archaeele bzw. fungale DNA mit der erwarteten Bandlänge. Mit „PC“ bezeichnete Banden sind Positivkontrollen, mit „NC“ bezeichnete Negativkontrollen. Die mit „M“ bezeichneten Taschen wurden mit dem FastRuler Low Range DNA Ladder® (Thermo Scientific) befüllt. Für die Domäne der Fungi konnte keine entsprechende Konzentration erreicht werden, dass Banden sichtbar hätten gemacht werden können.

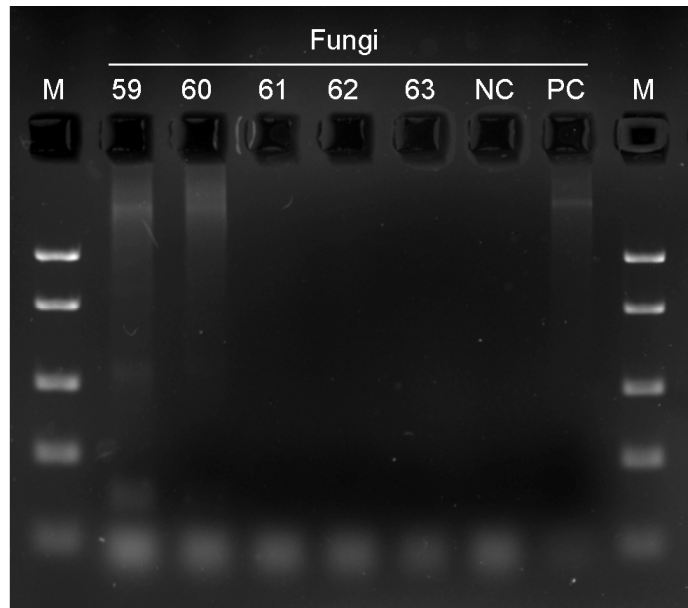


Abbildung 5: Gelbanden der Elektrophorese; Für die Domäne der Fungi konnte keine entsprechende Konzentration erreicht werden, dass Banden sichtbar hätten gemacht werden können. Mit „PC“ bezeichnete Banden sind Positivkontrollen, mit „NC“ bezeichnete Negativkontrollen. Die mit „M“ Taschen wurden mit dem FastRuler Low Range DNA Ladder® (Thermo Scientific) befüllt.

2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung und die Erstellung einer genomischen Datenbank wurde von der Core Facility für Molekularbiologie des ZMF der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Zur kurzen Zusammenfassung: die DNA-Konzentrationen werden mittels SequalPrep™ Normalization Plate (in-vitro) normalisiert, jede einzelne Probe wird mit einem eindeutigen Barcode versehen und einem Index hinzugefügt (8-Zyklen-Index-PCR). Die Sequenzierung selbst wurde mit einem Illumina® MiSeq® System MS-102-3003 MiSeq® Reagent Kit v3-600cycles (2x251 Zyklen) durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten (fastQ-Dateien) wurden zur weiteren Analyse bereitgestellt. Für die anschließende MiSeq® Datenanalyse wurde QIIME2® System (48) verwendet, wie zuvor beschrieben (49). Nach dem Filtern der Daten wurde der DADA2-Algorithmus (50) angewandt, um etwaige Ampliconfehler der bei der Sequenzierung generierten Daten zu korrigieren und in weiterer Folge Ampliconsequenzvarianten (ASV) zu generieren. Die Klassifizierung der ASVs erfolgte anhand der SILVA v132 Datenbank (51). Die daraus erhaltene ASV-Tabelle und die gewonnene Taxonomie-datei wurden für die weitere Analyse in Calypso (1) verwendet. ASVs aus Negativ- bzw. Extraktionskontrollen wurden aus dem Datensatz entfernt. Die ASVs, welche als Mitochondrien und Chloroplasten

identifiziert wurden, wurden ebenfalls entfernt. Es wurde für das Bakteriom eine Untergrenze von 200, für das Archaeom und Mykobiom von 100 Sequence Reads festgelegt, um eine validere Aussage über die Zusammensetzung der einzelnen Proben treffen zu können. Alle ASVs mit einer relativen Abundanz unter 0,001%, wurden über Calypso (1) von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Diese Kriterien führten dazu, dass bei der Analyse des Bakterioms 3 und bei der Analyse des Archaeoms und Mykobioms 24 bzw. 23 Proben ausgeschlossen wurden. Wir wählten Untergrenzen von 200 bzw. 100 Sequence Reads, um möglichst repräsentative Analysen durchführen zu können. Für die Normalisierung unserer Daten verwendeten wir das von Calypso empfohlene Verfahren TSS (total sum normalization) und für die Transformation die Variante der Quadratwurzel, die ebenfalls von Calypso empfohlen wird (1).

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Metadaten wurde mittels Pearson-Korrelation durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Parametern und Scores zu finden. Für die Analyse des Mikrobioms wurde das webbasierte Tool Calypso verwendet (1). Mit Calypso konnten wir unsere Proben einer LEfSe-Analyse (Linear discriminant analysis Effect Size) unterziehen, in der wir eruierten, welche Taxa vermehrt bei schweren Appendizitiden, hohen CRP-Werten und hohen Alvarado-Scores die höchste relative Abundanz besitzen. Danach analysierten wir die auffälligsten Taxa mittels Boxplot und Dotplot 2 und achteten dabei auf signifikante Unterschiede.

3 Resultate

Unser Ziel war es, bestimmte Taxa als aggressive oder protektive Faktoren hinsichtlich einer akuten Appendizitis im Kindes- und Jugendalter zu identifizieren. Dafür zogen wir die Proben von insgesamt 60 Patient*innen heran, von denen 42 männlichen und 18 Patient*innen weiblichen Geschlechts waren. Der jüngste Studienteilnehmer war 3 Jahre alt und männlichen Geschlechts, der älteste 17 Jahre alt und ebenfalls männlich. Im Mittel betrug das Patient*innenalter 11 Jahre. Neben dem Geschlecht und dem Alter wurden des Weiteren der PAS, der Alvarado-Score, die Höhe des CRP, der makroskopische und histologische Befund sowie der Schweregrad erhoben, um mögliche Einflüsse der Metadaten aufeinander bzw. auf die Zusammensetzung des Mikrobioms der Appendix vermiformis zu untersuchen. Um einen Überblick über die bakterielle Zusammensetzung unserer Appendixproben zu gewinnen wurde zunächst, wie in Materialien und Methoden beschrieben, eine Sequenzierung des Bakterioms unserer Proben durchgeführt. Diese ergab, dass sich die Gattung *Fusobacterium* an erster Stelle der fünfzehn relativ abundantesten Bakterien in unseren Proben wiederfindet. Dies bedeutet, dass *Fusobacterium* ein wesentlicher Faktor in der Entstehung einer Appendizitis sein könnte, was in vorangegangenen Studien bereits beschrieben wurde (52–55).

3.1 Analyse der Metadaten

Die Metadaten wurden größten Teils bei der Aufnahme-Untersuchung, sowie intra- und perioperativ erfasst. Aufgrund der Unterschiede bezüglich der Metadaten bietet sich ein heterogenes Bild der in der Studie eingeschlossenen Patient*innen. Die erhobenen Metadaten sind in Tabelle 23 im Anhang zu finden. Wir analysierten die erhobenen Metadaten in Microsoft™ Excel™ mittels Pearson-Korrelationskoeffizienten und p-Werte.

Wir konnten bei der Analyse möglicher linearer Zusammenhänge von Alvarado-Score und CRP-Wert, PAS und CRP-Wert, Alvarado-Score und histologischen Schweregrad, PAS und histologischen Schweregrad, Alvarado-Score und makroskopischen Befund, PAS und makroskopischen Befund sowie für makroskopischen Befund und CRP-Wert eine schwache bis mäßige Korrelation finden. Auch bei der Analyse des Zusammenhangs des CRP-Wertes und des

histologischen Schweregrades zeigte sich nur eine schwache lineare Korrelation. Der Alvarado-Score und PAS korrelieren hingegen fast perfekt linear miteinander. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Korrelationen innerhalb der Metadaten. Interpretation Korrelationskoeffizient r: $0,0 \leq r < 0,2$ → kein bis geringer, $0,2 \leq r < 0,5$ schwacher bis mäßiger, $0,5 \leq r < 0,8$ deutlicher, $0,8 \leq r \leq 1,0$ hoher bis perfekter linearer Zusammenhang. Interpretation p-Wert: $p < 0,001$ höchst signifikant, $0,001 \leq p < 0,01$ sehr signifikant, $0,01 \leq p < 0,05$ signifikant.

Korrelationen		
<i>Alvarado-Score und CRP-Wert</i>		<i>Signifikanz</i>
Korrelationskoeffizient r	0,326	
p-Wert	0,012	*
<i>PAS und CRP-Wert</i>		
Korrelationskoeffizient r	0,347	
p-Wert	0,007	**
<i>Alvarado-Score und histologischer Schweregrad</i>		
Korrelationskoeffizient r	0,215	
p-Wert	0,101	
<i>PAS und histologischer Schweregrad</i>		
Korrelationskoeffizient r	0,256	
p-Wert	0,051	
<i>Alvarado-Score und makroskopischer Befund</i>		
Korrelationskoeffizient r	0,326	
p-Wert	0,012	*
<i>PAS und makroskopischer Befund</i>		
Korrelationskoeffizient r	0,354	
p-Wert	0,006	**
<i>makroskopischer Befund und CRP-Wert</i>		
Korrelationskoeffizient r	0,434	
p-Wert	0,001	***
<i>histologischer Schweregrad und CRP-Wert</i>		
Korrelationskoeffizient r	0,281	
p-Wert	$1,070^{-6}$	***
<i>Alvarado-Score und PAS</i>		
Korrelationskoeffizient r	0,934	
p-Wert	$4,116^{-27}$	***

3.2 Analyse des Mikrobioms

Die Analyse der Zusammensetzung der Proben hinsichtlich der mikrobiellen Domänen ist in Abbildung 6 als Tortendiagramm dargestellt. Es scheint, als ob der Anteil des Bakterioms, im Vergleich zu einem niedrigen Grad, bei hohem und mittlerem Schweregrad der Entzündung ansteigt. Dem gegenübergestellt scheinen

archaeelle Taxa mit der Schwere der Erkrankung abzunehmen. Diese Unterschiede auf Domänenebene waren jedoch nicht statistisch signifikant.

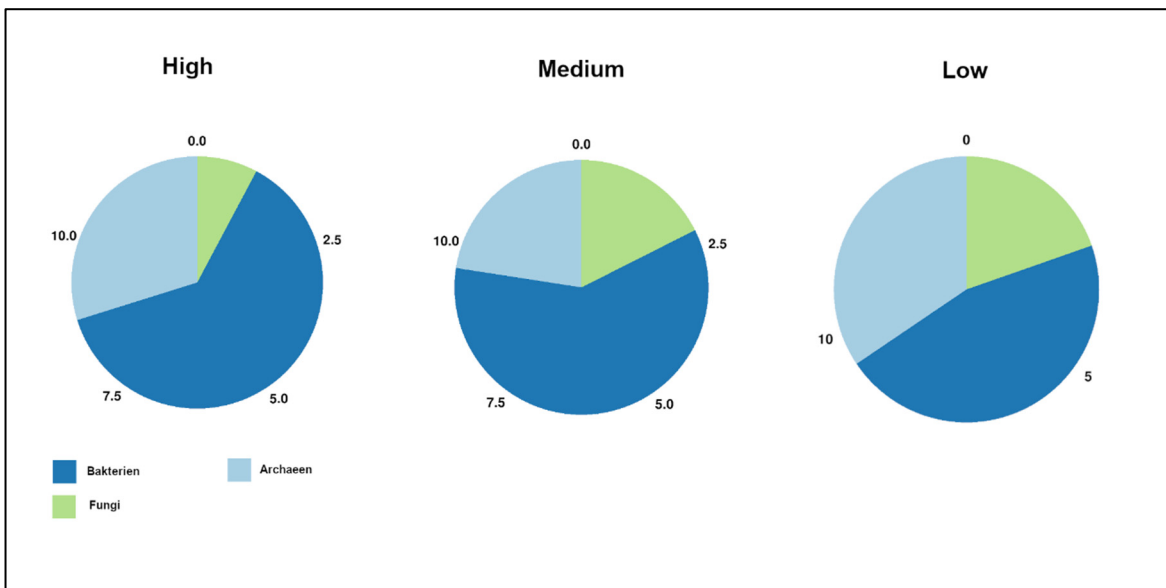


Abbildung 6: Zusammensetzung der Proben hinsichtlich des Königreichs und des Schweregrades; blau: Bakteriom („Bacteria“), hellblau: Archaeom („Archaea“), grün: Pilze („Fungi“)

3.2.1 Analyse des Bakterioms

Wir äußerten den Verdacht, dass gewisse Bakteriengattungen bezüglich einer akuten Appendizitis pathogener wirken als andere. Hierzu untersuchten wir welche Bakterien-Signaturen bei hochgradigen Entzündungen relativ erhöht vorkommen. Für die Beurteilung der Entzündungsintensität unserer Proben wählten wir die Höhe des CRP-Wertes und den makroskopischen Schweregrad. Wir untersuchten auch ob der in der diagnostischen Entscheidungsfindung gängige Alvarado-Score bei gewissen Bakteriengattungen möglicherweise einen höheren Wert vorweist als bei anderen. Die höchste Abundanz von allen Bakteriengattungen weist, wie in Tabelle 19 zu sehen, *Fusobacterium* auf.

Tabelle 19: Auflistung der 15 Bakteriengattungen mit der höchsten Abundanz, aufsummiert über alle 60 Patient*innen.

Familie	Gattung	Reads Overall
Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	115170
Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>	69885
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia-Shigella</i>	55912
Bacteroidaceae	<i>Bacteroides fragilis</i>	52861
Peptostreptococcales-	<i>Parvimonas</i>	47090
Erysipelotrichaceae	<i>Solobacterium moorei</i>	24926
Oscillospiraceae	<i>UCG-002</i>	20539
Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	19663
Veillonellaceae	<i>Dialister</i>	18543
Desulfovibrionaceae	<i>Bilophila</i>	18510
Rikenellaceae	<i>Alistipes</i>	17999
Tannerellaceae	<i>Tannerella</i>	15974
Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	14860
Gemellaceae	<i>Gemella</i>	13674
Campylobacteraceae	<i>Campylobacter</i>	13567

3.2.1.1 Bakteriom und Schweregrad der Appendizitis

Um eine Aussage über den Zusammenhang zwischen den einzelnen Bakteriengattungen und der Schwere der Appendizitis („Schweregrad Rating“) treffen zu können, wurde mittels Balkendiagramm die relative Abundanz der einzelnen Gattungen bei schweren, mittelgradigen und leichten Entzündungen der Appendix grafisch dargestellt. Es wurden die 10 am häufigsten vorkommenden Bakteriengattungen untersucht.

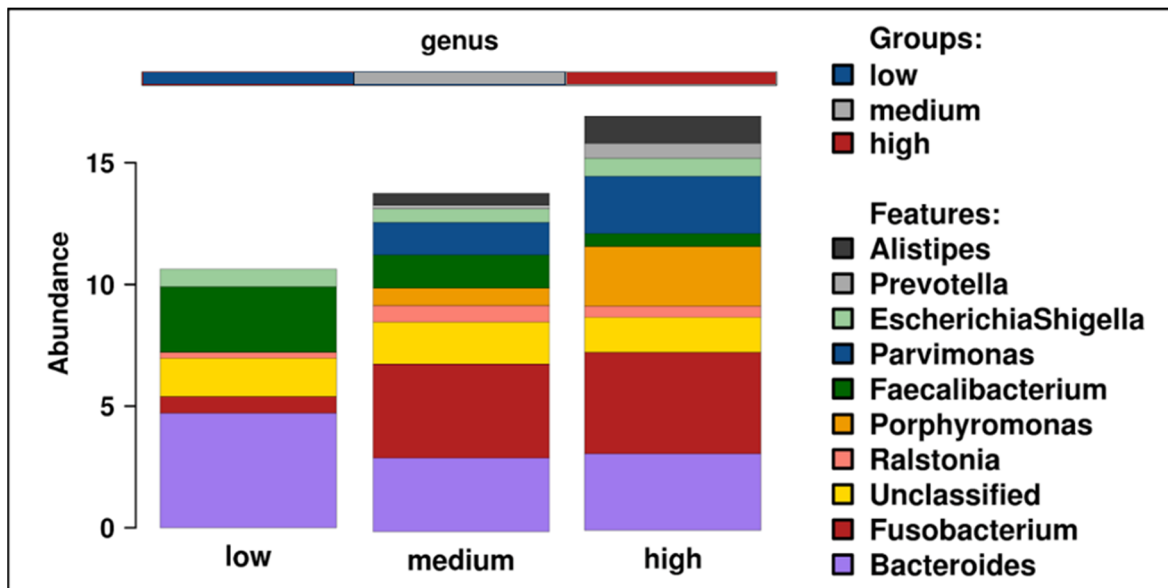


Abbildung 7: Bakteriom und Schweregrad der Appendizitis auf Gattungsebene („genus“); Gruppen: hochgradig („high“; rot), mittelgradig („medium“; grau) und niedriggradig („low“; blau);

Die Balkendiagramme zeigen ein gehäuftes Vorkommen von *Alistipes*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Fusobacterium* und *Porphyromonas* bei schweren und mittelgradigen Entzündungen. *Alistipes*, *Parvimonas* und *Porphyromonas* wiesen bei hochgradigen Appendizitiden eine hohe Abundanz auf. *Faecalibacterium* war bei hochgradigen Entzündungen in seiner Abundanz vermindert.

Um zu überprüfen, ob diese Gattungen tatsächlich ausschlaggebend für einen schweren Verlauf der Appendizitis waren oder potenzielle Marker für den Schweregrad darstellen, wurden zusätzlich noch LEfSe- und ANOVA-Analysen (analysis of variance) durchgeführt. Die LEfSe-Analyse ergab, dass *Porphyromonas* und *Parvimonas* stark mit hochgradigen Appendizitiden assoziiert waren, wie in Abbildung 8 zu sehen. Auch *Solobacterium* und *Peptostreptococcus* assoziierten mit einer hochgradigen Entzündung. Bei *Fusobacterium* ergab die LEfSe-Analyse eine Assoziation mit mittelgradigen Entzündungen.

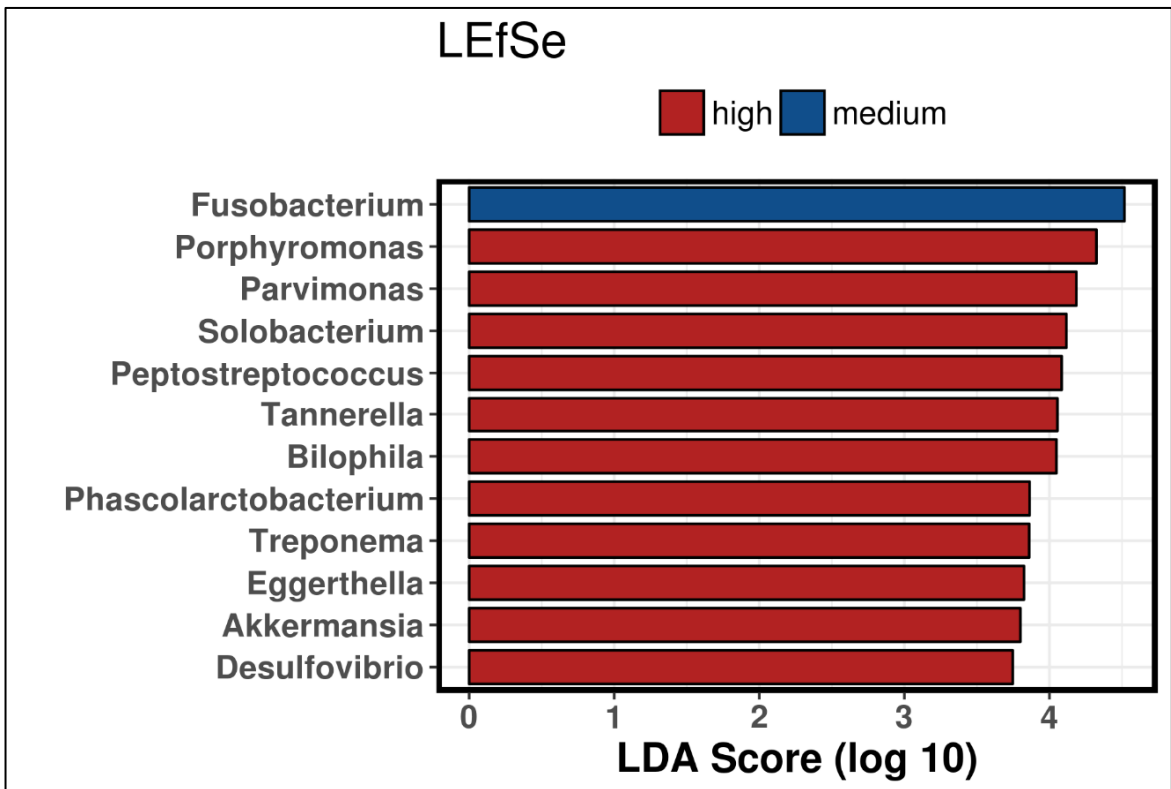


Abbildung 8: LEfSe-Analyse von Bakteriom und Schweregrad der Appendizitis auf Genus-Ebene; Gruppen: hochgradig ("high"; rot), mittelgradig ("medium"; blau)

Jene Gattungen, die bei der LEfSe-Analyse den höchsten Einfluss auf hochgradige Entzündungen der Appendix vorwiesen, wurden mittels ANOVA weiter analysiert. Gleiches gilt für *Fusobacterium* wie in Abbildung 9 zu sehen.

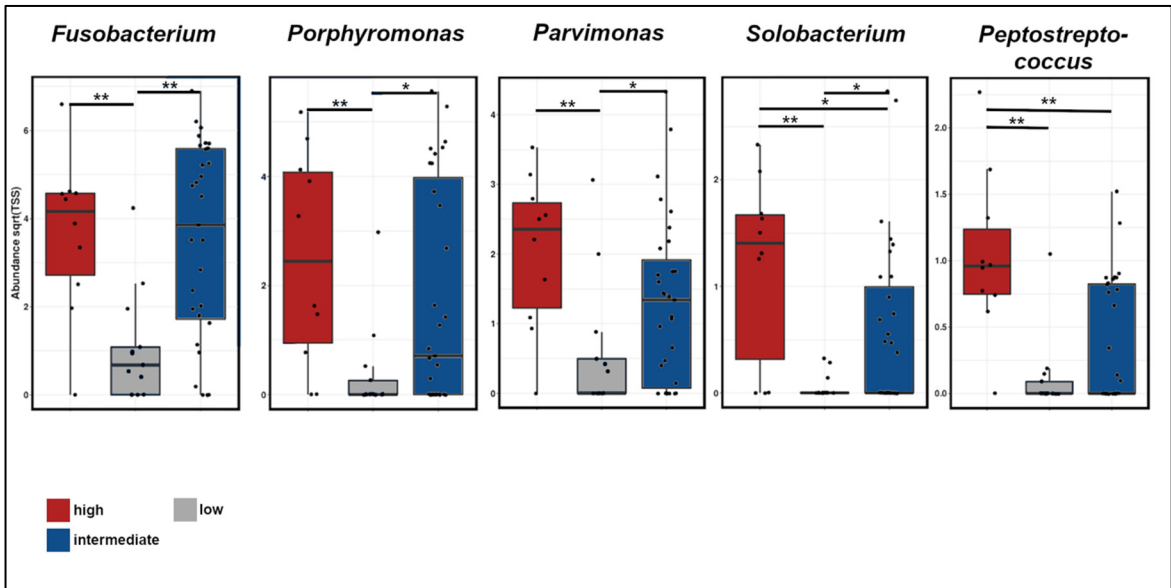


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen Schweregrad und relativer Abundanz von *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Parvimonas*, *Solobacterium* und *Peptostreptococcus* bei hochgradiger (4-5; rot), mittelgradiger (3; blau) und niedriggradiger (1 - 2; grau) Appendizitis auf Genus-Ebene; ** $0,001 \leq p < 0,01$, * $0,01 \leq p < 0,05$

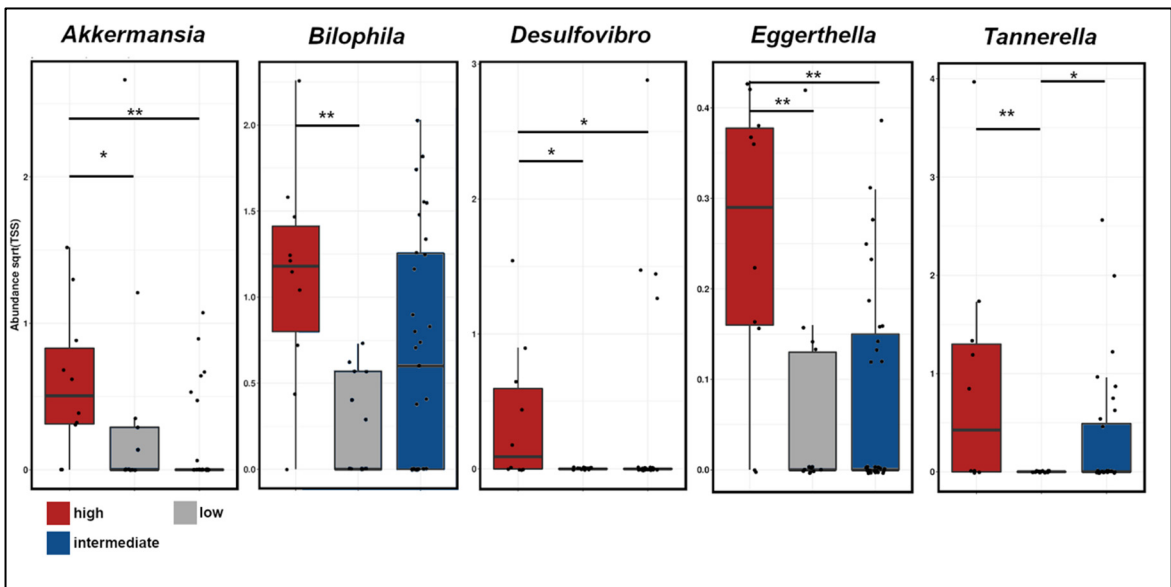


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen Schweregrad und Abundanz von *Akkermansia*, *Bilophila*, *Desulfovibro*, *Eggerthella* und *Tannerella* bei hochgradiger (4-5; rot), mittelgradiger (3; blau) und niedriggradiger (1 - 2; grau) Appendizitis auf Genus-Ebene; ** $0,001 \leq p < 0,01$, * $0,01 \leq p < 0,05$

Bei *Fusobacterium* ($p = 0,00097$), *Porphyromonas* ($p = 0,017$) und *Parvimonas* ($p = 0,01$) ergab die ANOVA signifikante Unterschiede der Abundanz zwischen hoch- und niedriggradigen, sowie zwischen mittel- und niedriggradigen Appendizitiden. Die signifikanten Unterschiede der Abundanz von *Solobacterium* ($p = 0,002$) zeigte

sich zwischen hoch- und niedriggradigen, hoch- und mittelgradigen und mittel- und niedriggradigen Entzündungen. Signifikante Abundanzunterschiede zeigten sich bei *Peptostreptococcus* ($p = 7^{-05}$) zwischen hoch- und niedriggradigen, sowie zwischen hoch- und mittelgradigen Appendizitiden. *Akkermansia* ($p = 0,034$) wies einen stark signifikanten Unterschied zwischen hoch- und mittelgradiger Entzündung auf, zwischen hoch- und niedriggradiger war ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Bei *Bilophila* ($p = 0,0044$), *Desulfovibro* ($p = 0,25$), *Tannerella* ($p = 0,015$) und *Eggerthella* ($p = 0,0012$) bestand ein hoch signifikanter Unterschied der Abundanz zwischen hoch- und niedriggradigen Entzündungen. Die Analyse von *Phascolarctobacterium* zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen hoch- und niedrig-, sowie zwischen hoch- und mittelgradiger Schwere. Die Abundanz von *Eggerthella* zeigte stark signifikante Unterschiede sowohl zwischen hoch- und niedriggradiger, als auch zwischen hoch- und mittelgradiger Entzündung. Unsere Analysen ergaben, dass mittel- und hochgradige Appendizitiden vermutlich im Zusammenhang mit einer Besiedelung durch *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Bilophila*, *Eggerthella* und *Tannerella* stehen.

3.2.1.2 Bakteriom und Alvarado-Score

Mittels LEfSe wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen einzelnen mikrobiellen Gruppen und der Höhe des Alvarado-Score untersucht. Die Analyse ergab, dass ein vermehrtes Vorkommen von *Escherichia/Shigella* (RSV 1196), *Gemella* (RSV 514), *Bacteroides* (RSV 243), *Campilobacter* (RSV 1060) und *Parabacteroides* (RSV 1062) bei hohen Alvarado-Scores (Score 7 – 10) bestand. Gegensätzliches Verhalten zeigte sich bei *Ralstonia* (RSV 1229) und *Dialister* (RSV 410): Hier wurde ein vermehrtes Vorkommen bei niedrigen Alvarado-Scores (Score 0 – 4) beobachtet.

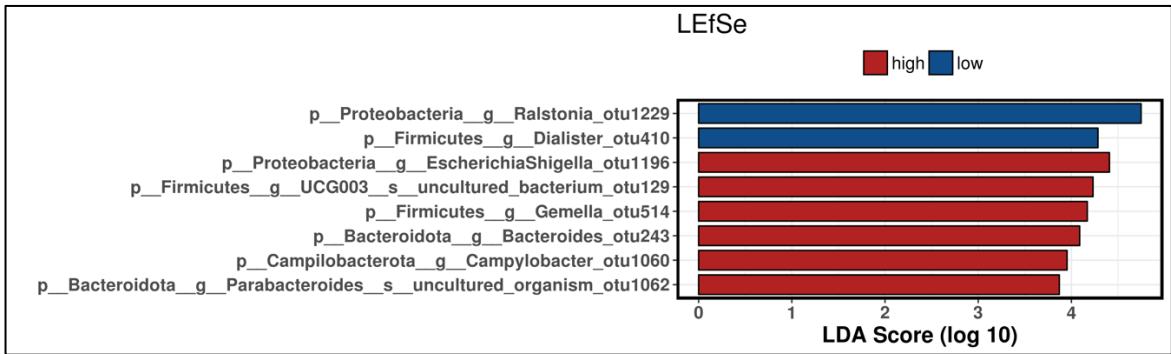


Abbildung 11: LEfSe-Analyse von Bakteriom und Alvarado-Score auf RSV-Ebene; rot: hoher Alvarado-Score („high“; 7 – 10), blau: niedriger Alvarado-Score („low“; 0 – 4)

Jene RSVs, die bei der LEfSe-Analyse die höchste Abundanz bei hohen Alvarado-Scores (Score 7 – 10) zeigten, wurden jeweils mittels ANOVA genauer untersucht (Abbildung 12).

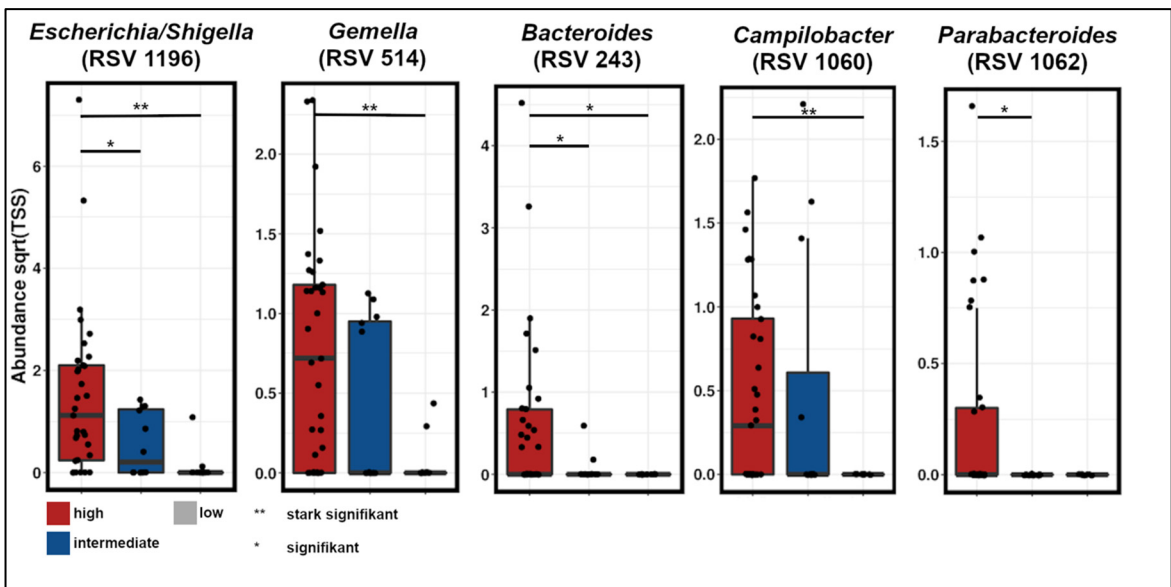


Abbildung 12: Alvarado-Score und Abundanz (Dotplot 2) auf RSV-Ebene von *Escherichia/Shigella* (RSV 1196), *Gemella* (RSV 514), *Bacteroides* (RSV 243), *Campilobacter* (RSV 1016) und *Parabacteroides* (RSV 1062) bei hohem (7 - 10; rot), mittleren (5 - 6; blau) und niedrigem (0 – 4; grau) Alvarado-Score; ** 0,001 ≤ p < 0,01, * 0,01 ≤ p < 0,05

Bei *Escherichia/Shigella* (RSV 1196; p = 0,012) zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Abundanz zwischen hohen und mittleren, sowie auch zwischen hohen und niedrigen Alvarado-Scores. Gleiches gilt auch für *Bacteroides* (RSV 243; p = 0,051). *Gemella* (RSV 514; p = 0,011) und *Campilobacter* (RSV 1060; p = 0,094) zeigten einen signifikanten Unterschied der Abundanz zwischen hohen und niedrigen Alvarado-Scores, nicht aber zwischen hohen und mittleren.

Parabacteroides (RSV 1062; $p = 0,051$) zeigte lediglich einen signifikanten Unterschied der Abundanz zwischen hohen und mittleren Alvarado-Scores. Hohe Alvarado-Scores standen unseren Analysen zu Folge mit einer Besiedelung oder Anreicherung von bestimmten RSVs von *Escherichia/Shigella* und *Gemella* stark signifikant im Zusammenhang. Dies ließ sich auch für das Taxon *Bacteroides* erkennen, welches im Vergleich zu niedrige, bei hohen Alvarado-Scores eine signifikant erhöhte Abundanz aufwies. Die Analysen auf Gattungsebene zeigten ein fast identisches Bild zu jenen auf RSV-Ebene. Sie können im Anhang unter Punkt 6.5 eingesehen werden.

3.2.1.3 Bakteriom und CRP-Wert

Für die Analyse der mikrobiellen Gruppen in Korrelation mit dem CRP-Wert wurde zunächst eine Analyse mit LEfSe durchgeführt, um zu sehen, welche Bakterien die größte Assoziation mit hohen CRP-Werten (>40 mg/L) vorweisen.

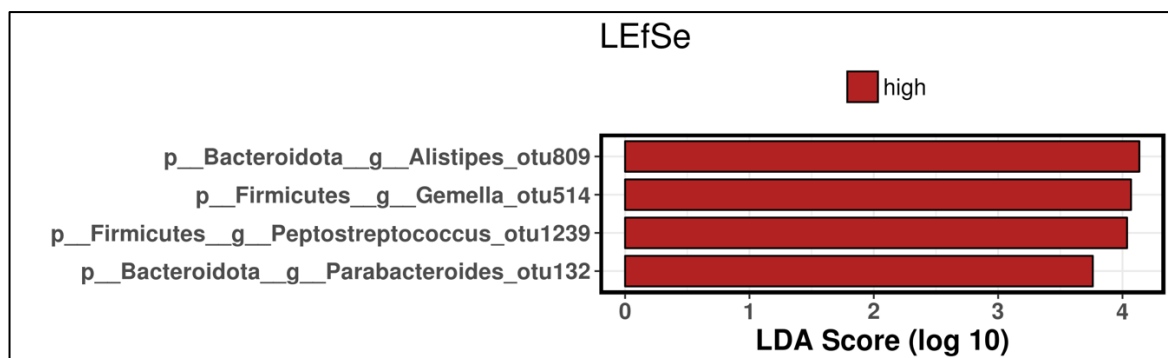


Abbildung 13: Abundanzen Bakterien-RSV bei hohem CRP-Wert auf RSV-Ebene; rot: hoher CRP-Wert (> 40 mg/L)

Bei der LEfSe-Analyse zeigte sich, dass *Alistipes* (RSV 809), *Gemella* (RSV 514), *Peptostreptococcus* (RSV 1239) und *Parabacteroides* (RSV 132) eine starke Assoziation mit hohen CRP-Werten vorwiesen. Dieses Ergebnis wurde mittels ANOVA verifiziert.

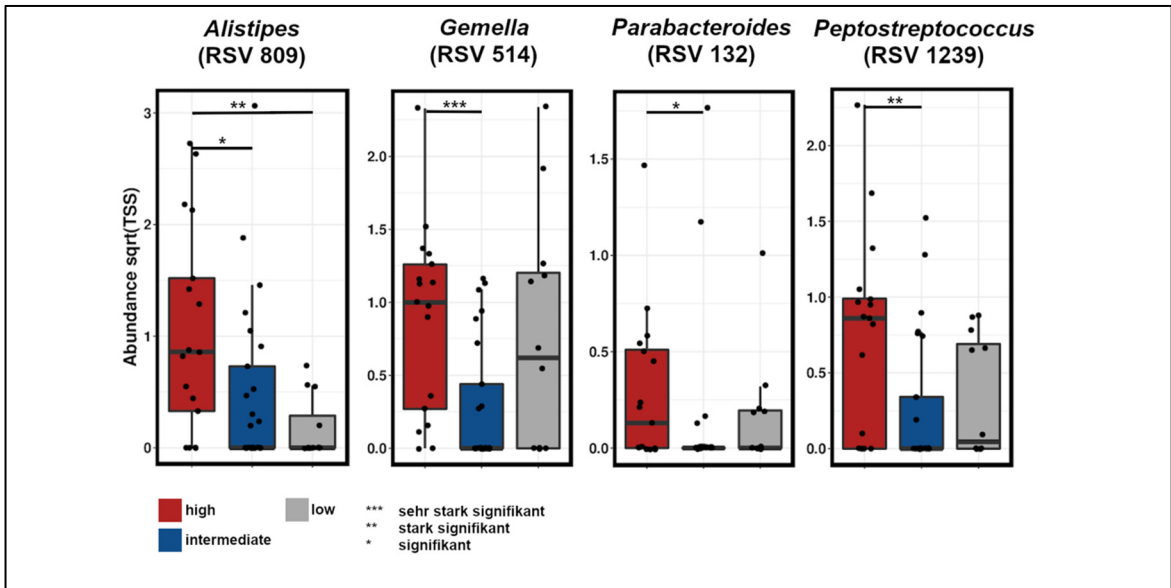


Abbildung 14: CRP-Werte und Abundanz von *Alistipes* (RSV 809), *Gemella* (RSV 514), *Parabacteroides* (RSV 132) und *Peptostreptococcus* (RSV 1239) auf RSV-Ebene; rot: hoher CRP-Wert („high“; >40 mg/L), blau: erhöhter CRP-Wert („increased“; 5 – 40 mg/L), grau: normaler CRP-Wert („normal“; <5 mg/L); * $p < 0,001$, ** $0,001 \leq p < 0,01$, * $0,01 \leq p < 0,05$**

Die Analyse mittels ANOVA zeigte, dass sich bei *Alistipes* (RSV 809) ein signifikanter Unterschied der Abundanz zwischen hohen („high“) und erhöhten („increased“), sowie zwischen hohen („high“) und normalen („normal“) CRP-Werten. Bei *Gemella* (RSV 514), *Parabacteroides* (RSV 132) und *Peptostreptococcus* (RSV 1239) zeigte sich ein signifikanter Abundanzunterschied zwischen hohen und erhöhten CRP-Werten, wohl aber nicht im Vergleich zwischen hohen und normalen Werten. Somit kann eine bestehende Verbindung zwischen *Alistipes* und hohen CRP-Werten angenommen werden. Die Analysen auf Gattungsebene zeigten ein fast identes Bild zu jenen auf RSV-Ebene. Sie können im Anhang unter Punkt 6.6 eingesehen werden.

3.2.2 Analyse des Archaeoms

3.2.2.1 Archaeelle Zusammensetzung der Proben in Korrelation mit dem Schweregrad der Appendizitis

In der Domäne der Archaeen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Proben hinsichtlich der drei Schweregrade (high, medium, low) gefunden werden. Hinsichtlich des Alvarado-Scores, PAS, CRP-Wertes konnten auch keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Auch die

Änderung der taxonomischen Einheit in Ebenen über der Genus-Ebene brachte keine signifikanten Unterschiede hervor. Es ließ sich lediglich eine Tendenz erkennen, dass *Methanogranum* und *Methanosphaera* bei schwereren Entzündungen der Appendix ein vermehrtes Auftreten vorweisen, was aber mit unseren Methoden nicht eindeutig bewiesen werden konnte.

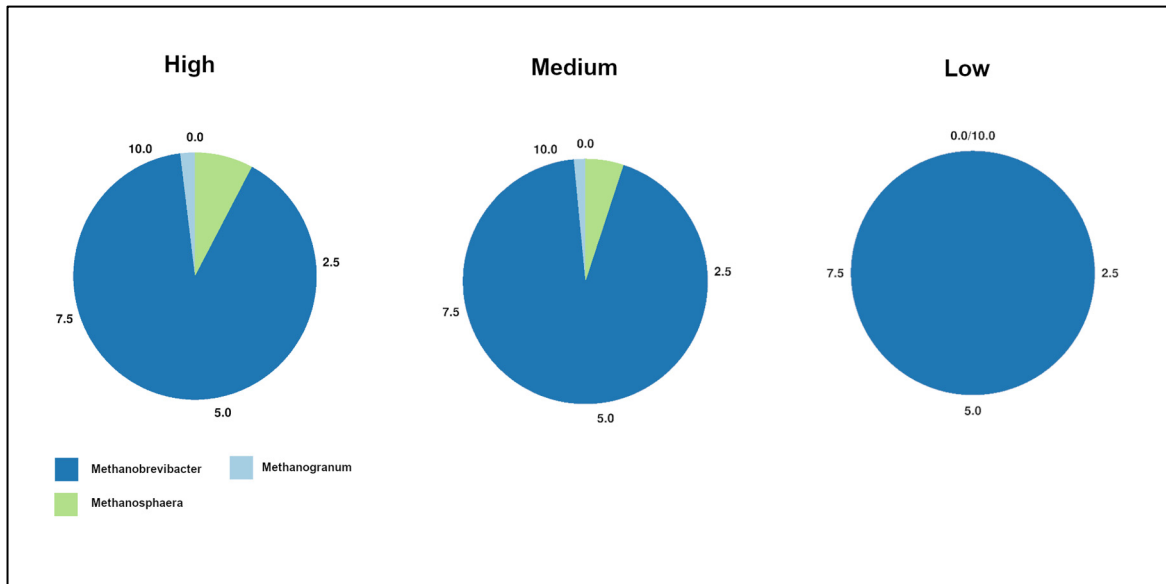


Abbildung 15: Zusammensetzung der Proben hinsichtlich des Archaeoms und des Schweregrades auf Gattungsebene; hellblau: *Methanogranum*, dunkelblau *Methanobrevibacter*, grün: *Methanosphaera*; „high“: hoher Schweregrad, „medium“: mittlerer Schweregrad, „low“: niedriger Schweregrad der Appendizitis

Es war lediglich zu beobachten, dass *Methanobrevibacter* in allen Proben, egal welcher Intensität sie zugeordnet werden konnten, die mit Abstand am häufigsten vorkommende Archaeengattung zu sein schien. *Methanobrevibacter* hatte in der Analyse mittels ANOVA einen P-Wert von $p=0,62$, *Methanosphaera* einen von $p=0,64$ und *Methanogranum* einen von $p=0,68$.

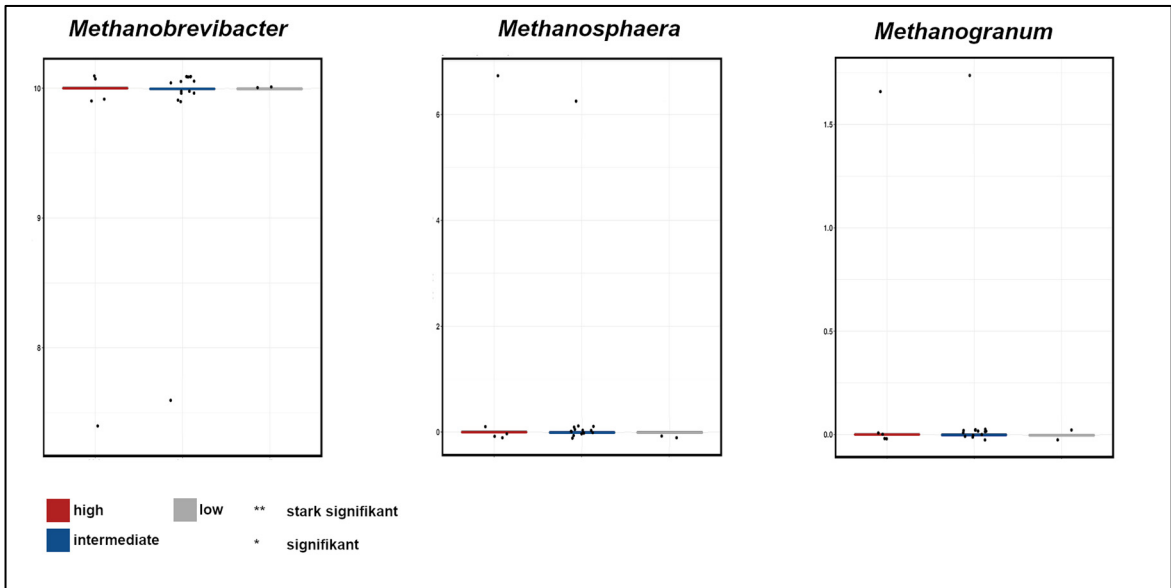


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Schweregrad und Abundanz von *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* und *Methanogranum* bei hochgradiger (4-5; rot), mittelgradiger (3; blau) und niedriggradiger (1 - 2; grau) Appendizitis auf Genus-Ebene;

3.2.3 Analyse des Mykobioms

Bei der Analyse des Mykobioms konnten unter zur Hilfenahme von LEfSe keine signifikant unterschiedlichen Abundanzen zwischen hohem, mittlerem und niedrigem Schweregrad gefunden werden. Wir konnten lediglich eine nicht-signifikante Tendenz für *Candida* und *Paraphoma* ausmachen, die bei schweren Appendizitiden ein vermehrtes Vorkommen aufwiesen. In der Analyse mit ANOVA konnte für *Candida* ein P-Wert von $p=0,31$ und für *Paraphoma* $p=0,13$ errechnet werden. Wir konnten keine Analyse der anderen Metadaten durchführen, da die Sequence Reads der verschiedenen Pilzstämme für die Analyse mit Calypso zu gering waren. Ein großer Anteil des Mykobioms unserer Proben konnte bei der Sequenzierung nicht klassifiziert werden.

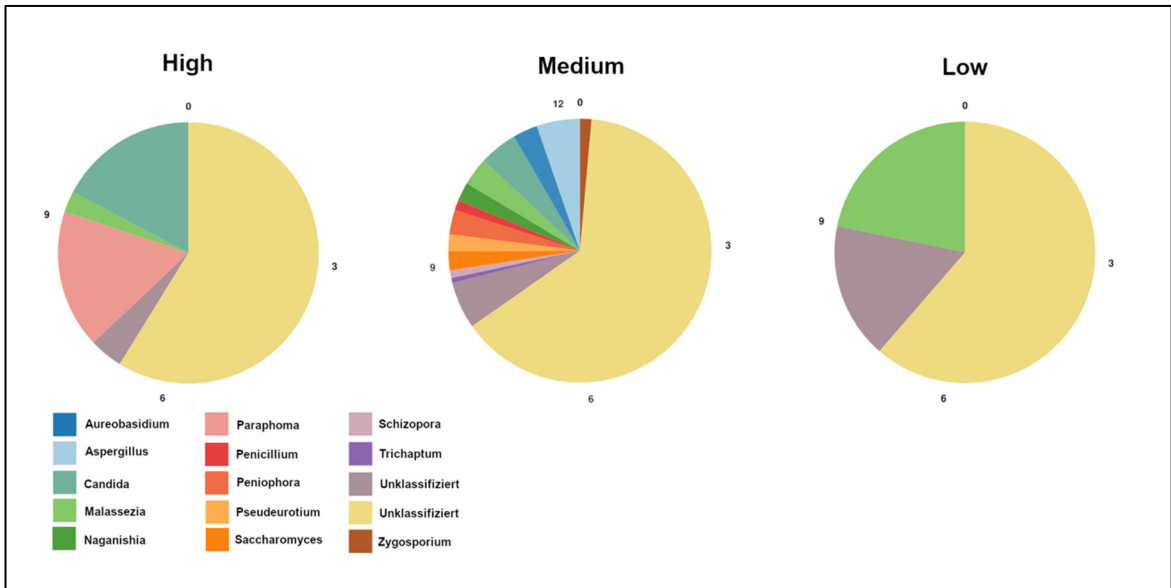


Abbildung 17: Zusammensetzung der Proben hinsichtlich des Mykobioms und des Schweregrades auf Gattungsebene; Der Großteil des Mykobioms konnte nicht klassifiziert werden (gelb & braun)

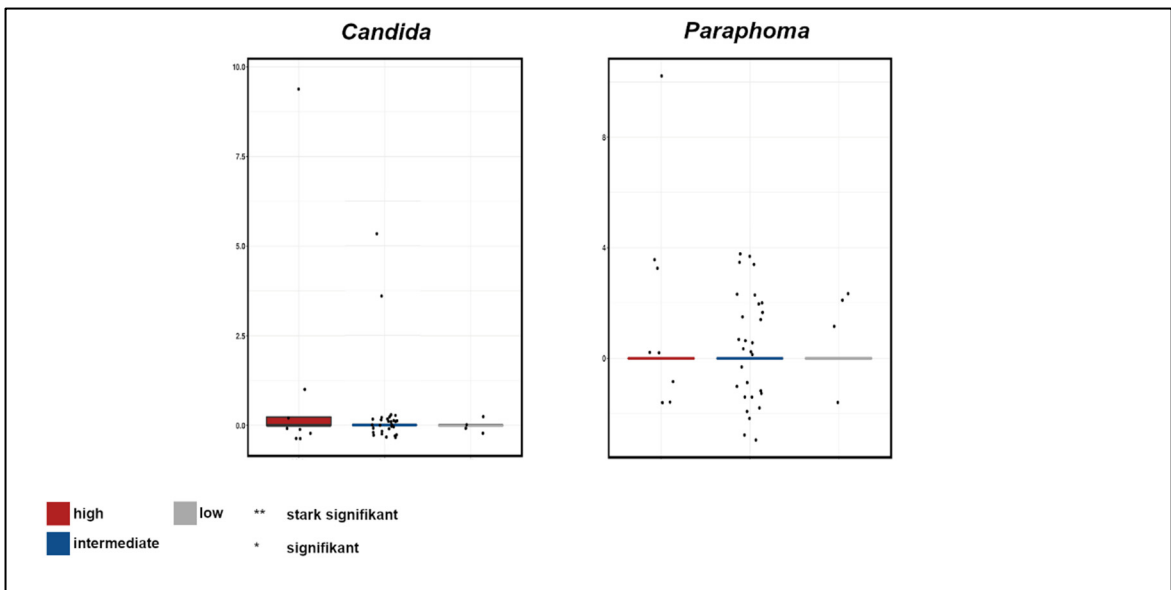


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen Schweregrad und Abundanz von *Candida* und *Paraphoma* bei hochgradiger (4-5; rot), mittelgradiger (3; blau) und niedriggradiger (1 - 2; grau) Appendizitis auf Genus-Ebene

4 Diskussion

Anders als in anderen Studien legten wir in unserer Arbeit den Fokus nicht nur auf die bakterielle Besiedelung der Appendix vermiformis, sondern auch auf das Archaeom und Mykobiom. In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Wurmfortsatz eine große Vielfalt an mikrobiellen Organismen beherbergt und eine Abänderung deren Abundanz der einzelnen Stämme im Zusammenhang mit einer Appendizitis steht.

4.1 Limitierungen der Studie

Die Ursache der Appendizitis ist wissenschaftlich noch nicht gänzlich geklärt und wird auch nur in einigen wenigen Publikationen behandelt, welche aber noch keine eindeutigen Schlussfolgerungen zulassen (52,53,55–59). Die Rolle des Archaeoms hinsichtlich der Appendizitis war überhaupt noch kein Gegenstand wissenschaftlicher Publikationen, was bezüglich der methodischen Herangehensweise eine gewisse Herausforderung darstellte. Aufgrund der geringen Datenlage ist es fraglich, ob in unserer Studie die geeignetste Methode gewählt wurde. Die gängigen DNA-Extraktionskits sind allesamt nicht spezifisch darauf ausgerichtet, DNA aus Appendix-Gewebe zu extrahieren, was eine Adaptierung des Vorgehens erforderlich machte. Auch die Interpretation der Daten hinsichtlich der archaeellen Besiedelung erwies sich als schwierig: die Abundanz der Archaeen in den Proben war sehr gering, was eine seriöse Beurteilung etwaiger Korrelationen zwischen Archaeom und Inflammationsgeschehen erschwerte. Gleiches lässt sich auch über die Analyse des Mykobioms sagen. Jedoch konnten wir signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des Bakterioms ermitteln.

4.2 Korrelationen innerhalb der Metadaten

Die Analyse der Metadaten ergab, dass weder der Alvarado-Score noch der PAS fundierte Rückschlüsse auf die Höhe des CRP-Wertes, den histologischen oder makroskopischen Schweregrad zulässt. Gleiches lässt sich auch für den Zusammenhang zwischen dem makroskopischen Schweregrad und der Höhe des CRP-Wertes sagen, welche auch nur mäßig korrelierten. Hingegen ließ sich bei der Höhe des Alvarado-Scores und des PAS eine nahezu perfekte lineare Korrelation beschreiben. Daraus ergibt sich, dass beide Scores in der Beurteilung einer

möglichen akuten Appendizitis bei Kindern und Jugendlichen gleichwertig sind. Unsere Analysen zeigten auch eine fast perfekte Korrelation zwischen dem CRP-Wert und dem histologischen Schweregrad, weswegen der CRP-Wert für die histologische Schwere der Appendizitis als Hinweis gesehen werden kann.

4.3 Zusammensetzung der Proben gegliedert nach mikrobiellen Domänen bei unterschiedlichem Schweregrad

Wie bereits Abbildung 6 zeigt, lässt sich bei schweren Entzündungen des Wurmfortsatzes ein anderes Verhältnis zwischen Bakterien, Archaeen und Fungi vermuten, als bei vergleichsweise leichten Appendizitiden. Ob nun das Archaeom einen protektiven Faktor der Appendixmikrobioms darstellt kann nicht eindeutig beantwortet werden, da die Datengewinnung aus den Appendixproben wegen den zuvor genannten Umständen ein schwieriges Unterfangen darstellte und nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob die von uns gewählte Variante die valideste darstellt. In unserem Fall lässt sich zumindest kein signifikanter Unterschied feststellen. Auffällig bleibt aber, dass bei einer vergleichsweise leichten Appendizitis das Archaeom weitaus stärkere Abundanz vorzuweisen scheint als bei einer schweren. Jedenfalls konnten Ghavami et al. 2018 beobachten, dass eine Verminderung der Archaeenbesiedelung, speziell derer von *Methanobrevibacter smithii*, als Biomarker für das Vorhandensein von entzündlichen Darmerkrankungen gesehen werden kann, was auch unsere Beobachtungen in Abbildung 14 vermuten lassen (60). Inwieweit das Bakteriom Einfluss auf das Archaeom und umgekehrt hat, muss noch in weiterführenden Studien geklärt werden.

4.4 Bakterielle Besiedelung in Korrelation mit dem Schweregrad der Appendizitis

Es war zu beobachten, dass bei mittelschweren und schweren Entzündungen der Appendix fünf Taxa die höchste Abundanz vorwiesen: *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Parvimonas*, *Solobacterium* und *Peptostreptococcus* (siehe Abbildungen 7, 8 und 9). Vertreter der Gram-negativen Fusobakterien sind Bestandteil des normalen Mikrobioms des Gastrointestinaltraktes und können auch im Magen und in der Mundhöhle gefunden werden (54,61). Fusobacteria konnten aber bereits in vorangegangenen Studien auch mit schweren Entzündungen der Appendix in Verbindung gebracht werden (52,53). Wir konnten Selbiges auch in unseren Analysen beobachten. Auch wenn Fusobacteria zum normalen Mikrobiom im Gastrointestinaltrakt gehören mögen konnte ihnen eine große Rolle bei der Entstehung von entzündlichen Vorgängen im Verdauungstrakt, darunter auch bei der Ausbildung einer Appendizitis, als opportunistisches Pathogen zugeschrieben werden (20,52,54).

Die Gram-negativen *Porphyromonas* und die Gram-positiven *Parvimonas* stellen hauptsächlich einen Bestandteil des oralen Mikrobioms dar und werden als ein Verursacher der Parodontitis gesehen (62–65). *Porphyromonas* wird hauptsächlich als pathogener Bestandteil des Kolonmikrobioms gesehen. Eine Inhabitation des physiologischen Mikrobioms des Kolons ist nicht eindeutig beschrieben (56,62,64,66). Weiters werden *Porphyromonas* im Gastrointestinaltrakt kanzerogene Eigenschaften zugewiesen (65,67). *Parvimonas* kann auch im Mikrobiom des Kolon wiedergefunden werden (68). Wir konnten eine höhere Abundanz dieser beiden Gattungen bei schweren Verläufen einer Appendizitis beobachten, was auch durch vorhergehende Studien bestätigt werden konnte (57,66,69). Die Pathogenität dieser beiden Gattungen ist auch als opportunistisch einzustufen, da sie in einer geringeren Abundanz zum normalen Mikrobiom des Mundes gehören und vermehrt bei schweren Appendizitiden im Wurmfortsatz gefunden werden können (62–64). *Peptostreptococcus* ist ein kommensal lebendes Bakterium, welches bei geschwächter Abwehrlage des Körpers opportunistisch pathogen wirken kann (69,70). Man findet es neben dem Gastrointestinaltrakt auch in der Mundhöhle, am gesamten Integument, im Urogenitaltrakt sowie in der Vagina

(69,70). Im Falle von *Solobacterium* gibt es keine Studien, die einen Zusammenhang mit einer Appendizitis beschreiben. *Solobacterium* und *Peptostreptococcus* sind beides Vertreter des normalen gastrointestinalen Mikrobioms, welche in unseren Analysen ein gehäuftes Vorkommen bei schweren Appendizitiden zeigten (69,71).

4.5 Bakterielle Besiedelung in Korrelation mit dem Alvarado-Score

Unsere Analysen ergaben für *Escherichia coli* (RSV 1196), *Gemella* (RSV 514), *Bacteroides* (RSV 243), *Campilobacter* (RSV 1060) und *Parabacteroides* (RSV 1062) ein vermehrtes Vorkommen bei hohen Alvarado-Scores. Wie eingangs erklärt setzt sich der Alvarado-Score aus verschiedenen Symptomen zusammen, die bei Vorhandensein mit Punkten bewertet werden. Je mehr Symptome einer akuten Appendizitis vorhanden sind, desto höher wird der Alvarado-Score und umso wahrscheinlicher ist das Vorliegen einer akuten Appendizitis. *Escherichia coli* (RSV 1196), *Gemella* (RSV 514), *Bacteroides* (RSV 243), *Campilobacter* (RSV 1060) und *Parabacteroides* (RSV 1062) waren zwar in den Analysen hinsichtlich des histologischen Schweregrades der Appendizitis nicht vertreten, scheinen aber mit einem höheren Alvarado-Score und folglich mit mehr Symptomen als andere Taxa bzw. RSV zusammenzuhängen. Eine schwerere bzw. vermehrte Symptomatik, hervorgerufen durch bestimmte bakterielle Taxa, ist in der bisherigen Literatur nicht beschrieben.

4.6 Bakterielle Besiedelung in Korrelation mit dem CRP-Wert

Bei der Analyse der Höhe des CRP-Wertes und der Korrelation mit dem Bakteriom stachen vier RSV hervor: *Alistipes* (RSV 809), *Gemella* (RSV 514), *Peptostreptococcus* (RSV 1239) und *Parabacteroides* (RSV 132). Diese RSV korrelierten in unserer Studie mit der höchsten Ausschüttung des C-reaktiven Proteins. Dieses Ergebnis müsste noch in weiterführenden Studien genauer untersucht werden, da noch keine Studien existieren, ob Infektionen mit bestimmten Bakterien im Zusammenhang mit einer akuten Appendizitis einen höheren CRP-Wert verursachen als andere.

4.7 Archaeelle Besiedelung in Korrelation mit dem Schweregrad der Appendizitis

Methanobrevibacter wies die höchste Abundanz unter den Archaeen in unseren Proben auf (siehe Abbildung 15). Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da *Methanobrevibacter smithii* den dominantesten Vertreter der Archaeen im menschlichen Gastrointestinaltrakt darstellt (72). Wie eingangs erwähnt kann eine Alteration der Archaeenpopulation als Indikator für entzündliche Darmerkrankungen gesehen werden (60). Wir konnten keine signifikante Abundanzveränderung von *Methanobrevibacter* in hoch- bzw. niedriggradigen Appendizitiden ausmachen. Wir konnten lediglich eine nicht-signifikante Tendenz, bei der es zu einer Verminderung von *Methanobrevibacter* bei schweren Erkrankungen kommt, feststellen. Ob die Verminderung der Abundanz von *Methanobrevibacter* ausschlaggebend für das Entstehen einer Appendizitis ist, ging aus unseren Analysen nicht eindeutig hervor. Dies erscheint jedoch aufgrund der vorliegenden Daten als sehr unwahrscheinlich. Hinsichtlich des Alvarado-Scores und CRP-Wertes konnte keine unterschiedliche Abundanz zwischen den verschiedenen Graduierungen gefunden werden. Es kann zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Archaeen einen Einfluss auf die Pathogenese bei akuter Appendizitis aufweisen. Möglicherweise muss eine andere DNA-Extraktionsmethode gewählt oder eine Anreicherung von archaeellen Taxa vorgenommen werden um die Limitierung der sehr geringen Abundanz zu umgehen. Cuív et al. untersuchten in ihrer Studie ein geeignetes DNA-Extraktionsverfahren aus menschlichen Kolonproben. Ihre Studie zeigte, dass die HMW-Methode („salting out and high molecular weight“) und die RBB+C-Methode („repeated bead beating and column“) effiziente Methoden zur Extraktion von bakterieller DNA aus Kolongewebe sind (73).

4.8 Fungale Besiedelung in Korrelation mit dem Schweregrad der Appendizitis

Wir konnten in unseren Analysen zum Zusammenhang zwischen dem Mykobiom und der Schwere der Appendizitis keine signifikanten Abundanzunterschiede in den verschiedenen Schweregraden ausmachen. Es lässt sich aber anhand der Analysen nur eine Tendenz zum vermehrten Vorkommen von *Candida* und *Paraphoma* bei schweren Appendizitiden erkennen. In der bisherigen Literatur wird die fungale Appendizitis fast ausschließlich bei immunsupprimierten Patient*innen beschrieben (74,75). Da bei keinem bzw. keiner unserer Patient*innen eine Immunsuppression bekannt war, dürfte die erhöhte Abundanz von *Candida* und *Paraphoma* bei schweren Entzündungen nur einen begleitenden Charakter haben. Auch für das Mykobiom gilt es, aufgrund der Limitationen hinsichtlich der sehr geringen Abundanz, eine geeignetere DNA-Extraktionsmethode zu finden. Hier könnten die HWM- oder RBB+C-Methode ebenfalls dienlich sein (73). Eine Anreicherung der fungalen Taxa könnte, wie auch bei den archaeellen Taxa, notwendig sein (47).

4.9 Mögliche Ansätze zur Therapie der akuten Appendizitis bei Kindern und Jugendlichen

Unter anderem konnten wir in unseren Analysen eine gesteigerte Abundanz von *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Parvimonas*, *Solobacterium*, *Akkermansia* und *Eggerthella* in Appendixproben mit schweren Entzündungen beschreiben. *Escherichia/Shigella* und *Gemella* sind unter anderem Vertreter, die mit einem erhöhten Alvarado-Score und somit mit mehr Symptomen einhergehen. *Alistipes* weist eine hohe Abundanz in Proben mit hohen CRP-Werten auf. Wie in anderen Studien bereits beschrieben könnte eine Antibiose die chirurgische Therapie ersetzen, vorausgesetzt es handelt sich um eine unkomplizierte Appendizitis (76–78). Dies würde heißen, dass Kindern und Jugendlichen mit akuter Appendizitis das Risiko einer Narkose bzw. Operation erspart werden könnte. Bei komplizierten Entzündungen der Appendix (z.B. Gangrän, Koprolith, Perforation) ist die operative Versorgung nach wie vor als Mittel der Wahl anzusehen (76–78).

Inwieweit Archaeen als therapeutischer Ansatz gesehen werden können ist nach wie vor unklar. Unsere Analysen ergaben keine signifikanten Unterschiede der Abundanz zwischen schweren und leichten Formen der akuten Appendizitis. Wir konnten mit unseren Methoden nur eine Tendenz erkennen, wobei *Methanobrevibacter* einen protektiven Faktor darzustellen scheint. Diesbezüglich gibt es noch keinerlei Studien, was ein weiteres Erforschen der Aufgaben der Archaeen in Bezug auf die Gesundheit der Appendix vermiformis bei Kindern und Jugendlichen unabdingbar macht.

4.10 Ausblick

Die gegenseitige Beeinflussung von Bakteriom, Archaeom und Mykobiom und deren Folgen für die Gesundheit der Appendix vermiformis ist noch gänzlich unerforscht. Um die Pathomechanismen hinter dieser häufigen Erkrankung zu verstehen muss die Rolle der Archaeen im Wurmfortsatz noch genauer beleuchtet werden. Diese könnte z.B. durch die Kultivierung und Verabreichung von Appendix-bewohnenden Archaeen, zusätzlich zur gängigen konservativen Therapie, bei akuter Appendizitis untersucht werden.

4.11 Zusammenfassung

Bei einer akuten Appendizitis bei Kindern und Jugendlichen konnte eine statistisch signifikante Abundanz von *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Parvimonas*, *Solobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Akkermansia*, *Bilophila*, *Desulfovibro*, *Eggerthella* und *Tannerella* bei schweren Appendizitiden festgestellt werden. Bei hohen Alvarado-Scores, sprich sehr symptomhaften Appendizitiden, konnten von uns die bakteriellen Taxa *Escherichia/Shigella*, *Gemella*, *Bacteroides*, *Campilobacter* und *Parabacteroides* signifikant in erhöhter Abundanz beschrieben werden. Bei Appendizitiden mit hohen CRP-Werten fanden wir *Alistipes*, *Gemella*, *Parabacteroides* und *Peptostreptococcus* mit signifikant erhöhter Abundanz vorliegen. Bezüglich dem Archaeom konnten von uns Tendenzen hinsichtlich einer Verminderung von *Methanobrevibacter* und einer erhöhten Abundanz von *Methanogranum* und *Methanosphaera* bei schweren Appendizitiden beschrieben werden, welche sich aber als nicht signifikant herausstellten. Gleiches lässt sich für *Candida* und *Paraphoma* in der Domäne der Fungi sagen, welche auch nicht-

signifikante Tendenzen einer erhöhten Abundanz bei schweren Appendizitiden zeigten.

5 Literaturverzeichnis

1. Zakrzewski M, Proietti C, Ellis JJ, Hasan S, Brion MJ, Berger B, et al. Calypso: A user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-environment interactions. *Bioinformatics*. 2017;33(5):782–3.
2. Straube E. Mikroorganismen [Internet]. Pschyrembel online. 2018 [cited 2020 Aug 24]. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Kontagionsindex/K0C39>
3. Linder H. Linder Biologie. 22.Auflage. Bayrhuber H, Kull U, editors. Braunschweig: Schroedel Verlag GmbH; 2005.
4. Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie. 7. Auflage. Thieme; 2019.
5. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8(1):1–22.
6. Cani PD. Human gut microbiome : hopes , threats and promises. *Gut*. 2018;67(9):1716–1725.
7. Winter G, Hart RA, Charlesworth RPG, Sharpley CF. Gut microbiome and depression : what we know and what we need to know. 2018;29(6):629–43.
8. Heller R. Mikrobiom [Internet]. Pschyrembel online. 2017 [cited 2020 Aug 24]. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Mikrobiom/B08TV/doc/>
9. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : The primary kingdoms. 1977;74(11):5088–90.
10. Gaba E. Phylogenetic tree [Internet]. Wikimedia Commons. 2006 [cited 2020 Aug 24]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phylogenetic_tree.svg
11. Blohs M, Moissl-Eichinger C, Mahnert A, Spang A, Dombrowski N, Krupovic M, et al. Archaea-an introduction [Internet]. 4th ed. Vol. 1, Encyclopedia of Microbiology. Elsevier Inc.; 2019. 243–252 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20884-4>

12. Walther R. Glukane [Internet]. Pschyrembel online. 2017 [cited 2020 Sep 22]. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Glukane/K08WU/doc/>
13. Margraf J. Gerlach-Klappe [Internet]. Pschyrembel online. 2016 [cited 2020 Aug 22]. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Angst/K02DX/doc/>
14. Siegert H. Bauhin-Klappe [Internet]. Pschyrembel online; 2017. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Kontagionsindex/K0C39>
15. Anderhuber F, Pera F, Streicher J. Waldeyer – Anatomie des Menschen. 19. Auflag. Walter De Gruyter GmbH & Co. KG; 2012.
16. Paulsen F, Waschke J. Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen - Innere Organe. 23. Auflag. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2010.
17. Thiel W. Photographischer Atlas der praktischen Anatomie. 2. Auflage. Springer-Verlag; 2002.
18. Kooij IA, Sahami S, Meijer SL, Buskens CJ, te Velde AA. The immunology of the vermiform appendix: a review of the literature. *Clin Exp Immunol.* 2016;186(1):1–9.
19. Barlow A, Muhleman M, Gielecki J, Matusz P, Tubbs RS, Loukas M. The vermiform appendix: A review. *Clin Anat.* 2013;26(7):833–42.
20. Vitetta L, Chen J, Clarke S. The vermiform appendix: An immunological organ sustaining a microbiome inoculum. *Clin Sci.* 2019;133(1):1–8.
21. Höfler G, Kreipe HH, Moch H. Pathologie - Das Lehrbuch. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2019.
22. Alder AC, Fomby TB, Woodward WA, Haley RW, Sarosi G, Livingston EH. Association of viral infection and appendicitis. *Arch Surg.* 2010;145(1):63–71.
23. Faldetta KF, Kattakuzhy S, Wang HW, Sereti I, Sheikh V. Cytomegalovirus immune reconstitution inflammatory syndrome manifesting as acute appendicitis in an HIV-infected patient. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):1–4.

24. McCarty TP, Lee RA, Herfel BM, Pappas PG. Cytomegalovirus appendicitis in solid organ transplant patients, two cases and a review. *J Clin Virol* [Internet]. 2015;66:48–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.03.004>
25. Kothari A, Caradine KD, Rico JCC, Sasapu A, Veeraputhiran MK, Jethava Y, et al. Cytomegalovirus appendicitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2017;19(5).
26. Canterino JE, McCormack M, Gurung A, Passarelli J, Landry ML, Golden M. Cytomegalovirus appendicitis in an immunocompetent host. *J Clin Virol* [Internet]. 2016;78:9–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.011>
27. von Schweinitz U. *Kinderchirurgie*. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
28. Dingemann J, Ure B. Imaging and the use of scores for the diagnosis of appendicitis in children. *Eur J Pediatr Surg*. 2012;22(3):195–200.
29. Goulder F, Simpson T. Pediatric appendicitis score: A retrospective analysis. *J Indian Assoc Pediatr Surg*. 2008;13(4):125–7.
30. Alvarado A. A practical score for the early diagnosis of acute appendicitis. *Ann Emerg Med*. 1986;15(5):557–64.
31. Waskale V, Singh A, Gaharwar APS, Singh V. Evaluation of Role of Alvarado Score in Diagnosis of Acute Appendicitis: A Prospective Study. *Ann Int Med Dent Res*. 2016;2(6):1–4.
32. Samuel M. Pediatric appendicitis score. *J Pediatr Surg*. 2002;37(6):877–81.
33. Šimonovský V. Ultrasound in the Differential Diagnosis of Appendicitis. *Clin Radiol*. 1995;50(11):768–73.
34. Bongard F, Francisco S, Landers D V, Francisco S, Lewis F, Francisco S. Differential Diagnosis of Appendicitis and Pelvic Inflammatory Disease A Prospective Analysis. *Am J Surg*. 1985;150(1):90–6.

35. Katkhouda N, Mason RJ, Towfigh S, Gevorgyan A, Essani R. Laparoscopic Versus Open Appendectomy: A Prospective Randomized Double-blind Study. *Adv Surg.* 2006;40:1–19.
36. Moazzez A, Mason RJ, Katkhouda N. Thirty-day outcomes of laparoscopic versus open appendectomy in elderly using ACS / NSQIP database. 2013;1061–71.
37. Svensson JF, Eaton S. A Review of Conservative Treatment of Acute Appendicitis. *Eur J Pediatr Surg.* 2012;22:185–94.
38. § 21 Abs. 2 ABGB.
39. Helke KL, Swindle MM. Animal models of toxicology testing: The role of pigs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(2):127–39.
40. Swindle MM, Smith AC. *Swine in the Laboratory: Surgery, Anesthesia, Imaging, and Experimental Techniques.* 3. Ausgabe. CRC Press Taylor & Francis Group; 2016.
41. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Vet Pathol.* 2012;49(2):344–56.
42. Kobayashi E, Hishikawa S, Teratani T, Lefor AT. The pig as a model for translational research: Overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant Res.* 2012;1(1):1–9.
43. Matsunari H, Nagashima H. Application of genetically modified and cloned pigs in translational research. *J Reprod Dev.* 2009;55(3):225–30.
44. McAnaulty PA, Dayan AD, Ganderup N-C, Hastings KL. *The Minipig in Biomedical Research.* 1. Ausgabe. CRC Press Taylor & Francis Group; 2012.
45. Critser JK, Laughlin MH, Prather RS, Riley LK. Proceedings of the conference on swine in biomedical research. *ILAR J.* 2009;50(1):89–94.
46. Fritsch H, Kühnel W. *Taschenatlas der Anatomie, Band 2: Innere Organe.* 12. Auflag. Stuttgart: Thieme; 2018. 488 p.

47. Thoendel M, Jeraldo PR, Greenwood-Quaintance KE, Janet Z, Chia N, Hanssen AD, et al. Comparison of microbial DNA enrichment tools for metagenomic whole genome sequencing. *J Microbiol Methods*. 2016;141–5.
48. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852–7.
49. Mahnert A, Haratani M, Schmuck M, Berg G. Enriching beneficial microbial diversity of indoor plants and their surrounding built environment with biostimulants. *Front Microbiol*. 2018;9(DEC):1–17.
50. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581–3.
51. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):590–6.
52. Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Theissig F. Acute appendicitis is characterized by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut*. 2009;60(1):34–40.
53. Rogers MB, Brower-sinning R, Firek B, Zhong D, Morowitz MJ. Acute Appendicitis in Children Is Associated With a Local Expansion of *Fusobacteria*. *Clin Infect Dis*. 2016;63(1):71–8.
54. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. 2015;23:141–7.
55. Guinane CM, Tadrous A, Fouhy F, Anthony Ryan C, Dempsey EM, Murphy B, et al. Microbial composition of human appendices from patients following appendectomy. *MBio*. 2013;4(1):1–6.
56. Blod C, Schlichting N, Schülin S, Suttikus A, Peukert N, Stingu CS, et al. The oral microbiome—the relevant reservoir for acute pediatric appendicitis? *Int J Colorectal Dis*. 2018;33(2):209–18.

57. The SMML, Bakx R, Budding AE, De Meij TGJ, Van Der Lee JH, Bunders MJ, et al. Microbiota of Children with Complex Appendicitis: Different Composition and Diversity of the Microbiota in Children with Complex Compared with Simple Appendicitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(10):1054–60.
58. Elhag KM, Alwan MH, Al-Adnani MS, Sherif RA. *Bacteroides fragilis* is a silent pathogen in acute appendicitis. *J Med Microbiol*. 1986;21(3):245–9.
59. Bhangu A, Søreide K, Di Saverio S, Assarsson JH, Drake FT. Acute appendicitis: Modern understanding of pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet*. 2015;386(10000):1278–87.
60. Ghavami SB, Rostami E, Sephay AA, Shahrokh S, Balaii H, Aghdaei HA, et al. Alterations of the human gut *Methanobrevibacter smithii* as a biomarker for inflammatory bowel diseases. *Microb Pathog*. 2018;117:285–9.
61. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):732–7.
62. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1244–63.
63. Ota-Tsuzuki C, Alves Mayer MP. Collagenase production and hemolytic activity related to 16S rRNA variability among *Parvimonas micra* oral isolates. *Anaerobe*. 2010;16(1):38–42.
64. Jia L, Han N, Du J, Guo L, Luo Z, Liu Y. Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:1–14.
65. Koliarakis I, Messaritakis I, Nikolouzakis TK, Hamilos G, Souglakos J, Tsiaoussis J. Oral bacteria and intestinal dysbiosis in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17).

66. Zhong D, Brower-Sinning R, Firek B, Morowitz MJ. Acute appendicitis in children is associated with an abundance of bacteria from the phylum Fusobacteria. *J Pediatr Surg* [Internet]. 2014;49(3):441–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2013.06.026>
67. Liu XB, Gao ZY, Sun CT, Wen H, Gao B, Li SB, et al. The potential role of *P.gingivalis* in gastrointestinal cancer: A mini review. *Infect Agent Cancer*. 2019;14(1):1–7.
68. Baghban A, Gupta S. *Parvimonas micra*: A rare cause of native joint septic arthritis. *Anaerobe* [Internet]. 2016;39:26–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.02.004>
69. Jackson HT, Mongodin EF, Davenport KP, Fraser CM, Sandler AD, Zeichner SL. Culture-independent evaluation of the appendix and rectum microbiomes in children with and without appendicitis. *PLoS One*. 2014;9(4).
70. Jarry J, Shekher M, Imperato M, Michel P. Appendicitis: When there is more than meets the eye. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* [Internet]. 2011;35(11):765–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2011.05.014>
71. Sárvári KP, Sántha D, Kovács R, Körmöndi S, Pető Z, Vereb T, et al. Six cases of *Solobacterium moorei* isolated alone or in mixed culture in Hungary and comparison with previously published cases. *Anaerobe*. 2020;65.
72. Gaci N, Tottey W, Brugère J-F, Borrel G, William PO, Archaea BJ. TOPIC HIGHLIGHT WJG 20 th Anniversary Special Issues (17): Intestinal microbiota Archaea and the human gut: New beginning of an old story. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(43):16062–78. Available from: <http://www.wjgnet.com/esps/HelpDesk>:<http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx> <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i43/16062.htm>DOI:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16062>
73. Cuív PÓ, Aguirre de Cárcer D, Jones M, Klaassens ES, Worthley DL, Whitehall VLJ, et al. The Effects from DNA Extraction Methods on the Evaluation of Microbial Diversity Associated with Human Colonic Tissue. *Microb Ecol*. 2011;61(2):353–62.

74. Larbcharoensub N, Boonsakan P, Kanoksil W, Wattanatranoon D, Phongkitkarun S, Molagool S, et al. Fungal appendicitis: a case series and review of the literature. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal.* 213AD;
75. Choy KT, Chiam HC, Zardawi I. Fungal appendicitis in a non-immunocompromised woman. *BMJ Case Rep.* 2019;12(7):10–3.
76. Huang L, Yin Y, Yang L, Wang C, Li Y, Zhou Z. Comparison of antibiotic therapy and appendectomy for acute uncomplicated appendicitis in children a meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 2017;171(5):426–34.
77. Salminen P, Tuominen R, Paajanen H, Rautio T, Nordström P, Aarnio M, et al. Five-year follow-up of antibiotic therapy for uncomplicated acute appendicitis in the APPAC randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2018;320(12):1259–65.
78. Podda M, Gerardi C, Cillara N, Fearnhead N, Gomes CA, Birindelli A, et al. Antibiotic treatment and appendectomy for uncomplicated acute appendicitis in adults and children: A systematic review and meta-analysis. *Ann Surg.* 2019;270(6):1028–40.

6 Anhang

6.1 Protokolle der Extraktionskits

6.1.1 XSB-Extraktion-Protokoll

Die Pufferlösung wurde händisch und unter sterilen Bedingungen hergestellt. Sie wurde auch gleich nach ihrer Herstellung zur Extraktion verwendet. Für die Extraktion selbst wurde der Falcon-Behälter mit dem darin enthaltenen XSB so lange in einem 60°C warmen Wasserbad belassen, bis die Pufferlösung durchsichtig wurde.

Währenddessen wurden die Proben aufgetaut und für das Bead-Beating vorbereitet.

In die Bead-Beating-Röhrchen mit den darin enthaltenen, bereits aufgetauten, Proben vom Schweinepräparat wurden 200 µL des XSB und 200 µL 1X-konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate-buffered saline“; PBS) gegeben.

Anschließend an das Zusammenführen mit den Puffern durchliefen die Proben in einem MagNA Lyser[®] zwei Rotationszyklen bei 6500 rpm zu je 30 Minuten.

Nach dem Bead-Beating der Proben wurden diese für 10 Sekunden auf einem Vortex-Mixer durchmischt ehe sie für 2 Stunden in einen Thermoshaker[®] bei 65°C gegeben wurden.

Als die Wärmebehandlung beendet war, wurden die Proben für 2 Sekunden wieder mit dem Vortex-Mixer durchgemengt und anschließend für 10 Minuten auf Eis gestellt.

Anschließend wurden die Proben bei 4°C mit 10.000 rpm für 3 min zentrifugiert und die obere Phase der Proben in Gel-Lock-Tubes überführt. Daraufhin wurden ~200 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol in die Proben pipettiert und danach bei 15°C und 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Hier wurden erneut 150 µL Chloroform hinzugefügt, die Probe im Vortex-Mischer 2 s durchmischt und wieder mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert.

Nach dem erneuten Durchgang in der Zentrifuge wurde wiederum die obere Phase entnommen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt.

Nun wurde das gleiche Volumen wie in der Probe Isopropanol, wie auch die 0,0057-fache Menge des Isopropanols an 7M Ammoniumacetat der Probe zugefügt.

Ein weiterer Zentrifugen-Durchgang bei 4°C und 13.000 rpm wurde für 30 min vorgenommen. Der resultierende Überstand wurde danach abpipettiert und das entstandene Pellet unter der sterilen Work-Bench für 24 h getrocknet.

Folgend wurde LiCrosolve® Water zur Lösung des Pellets in die Eppendorf-Tube gegeben und die Probe anschließend bei 37°C und 300 rpm für 30 min in einem Thermoshaker platziert.

Die Messung der DNA-Konzentration wurde mittels Qubit HS gemessen.

6.1.2 E.Z.N.A.® Stool DNA Kit

1. Add up to 200 mg stool sample in a 2 mL microcentrifuge tube (not provided) containing 200 mg Glass Beads X. Place the tube on ice. Note: If the sample is liquid, add 200 µL sample into the centrifuge tube. Cut the end of the pipet tip to make pipetting easier. If the sample is frozen, use a spatula to scrape the sample into the tube. Do not thaw the frozen sample until the SLX-Mlus Buffer is added into the tube.

2. Add 540 µL SLX-Mlus Buffer. Vortex at maximum speed for 10 minutes or until the stool sample is completely homogenized. Note: We recommend a mechanical disruptor instrument such as the SPEX Geno/Grinder 2010 or a flat bed vortexer with tape.

3. Add 60 µL DS Buffer and 20 µL Proteinase K Solution. Vortex or pipet up and down to mix thoroughly.

4. Incubate at 70°C for 10 minutes (13 minutes if frozen). Vortex the sample twice during incubation. Optional: For isolation of DNA from gram-positive bacteria, do a second incubation at 95°C for 5 minutes. Continue to Step 5.

5. Add 200 µL SP2 Buffer. Vortex at maximum speed for 30 seconds.

- 6.** Let sit on ice for 5 minutes.
- 7.** Centrifuge at maximum speed ($\geq 13,000 \times g$) for 5 minutes.
- 8.** Carefully aspirate 400 μL supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Do not to disturb the pellet or transfer any debris.
- 9.** Add 200 μL cHTR Reagent. Vortex at maximum speed for 10 seconds.

Note: cHTR Reagent must be completely resuspended before use. Cut the end of a 1 mL tip to make it easier to pipet the cHTR Reagent.

- 10.** Let sit at room temperature for 2 minutes.
- 11.** Centrifuge at maximum speed for 2 minutes.
- 12.** Transfer 250 μL supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.

Optional: If RNA-free DNA is required, add 10 μL RNase A (not provided). Vortex to mix thoroughly. Incubate at 37°C for 3 minutes. Continue to Step 13.

- 13.** Add 250 μL BL Buffer and 250 μL 100% ethanol. Vortex at maximum speed for 10 seconds.
- 14.** Insert a HiBind® DNA Mini Column into a 2 mL Collection Tube.
- 15.** Transfer the entire sample from Step 13, including any precipitates that may have formed, to the HiBind® DNA Mini Column.
- 16.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
- 17.** Discard the filtrate and the collection tube.
- 18.** Transfer the HiBind® DNA Mini Column into a new 2 mL Collection Tube.
- 19.** Add 500 μL VHB Buffer. Note: VHB Buffer must be diluted with 100% ethanol before use.
- 20.** Centrifuge at maximum speed for 30 seconds.
- 21.** Discard the filtrate and reuse the collection tube.

- 22.** Add 700 μL DNA Wash Buffer. Note: DNA Wash Buffer must be diluted with 100% ethanol before use.
- 23.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
- 24.** Discard the filtrate and reuse collection tube.
- 25.** Repeat Steps 22-24 for a second DNA Wash Buffer wash step.
- 26.** Centrifuge the empty HiBind[®] DNA Mini Column at maximum speed for 2 minutes at room temperature. Note: It is important to dry the column membrane before elution. Residual ethanol may interfere with downstream applications.
- 27.** Transfer the column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 28.** Add 100-200 μL Elution Buffer heated to 65°C directly to the center of the HiBind[®] matrix.
- 29.** Let sit at room temperature for 2 minutes.
- 30.** Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
- 31.** Store DNA at -20°C

6.1.3 DNeasy® PowerSoil® Kit

- 1.** Add 0.25 g of soil sample to the PowerBead Tube provided. Gently vortex to mix.
- 2.** Add 60 µl of Solution C1 and invert several times or vortex briefly. Note: Solution C1 may be added to the PowerBead tube before adding soil sample.
- 3.** Secure PowerBead Tubes horizontally using a Vortex Adapter for 24 (1.5–2.0 mL) tubes (cat. no. 13000-V1-24).
- 4.** Vortex at maximum speed for 10 min. Note: If using the 24-place Vortex Adapter for more than 12 preps, increase the vortex time by 5–10 min.
- 5.** Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 s.
- 6.** Transfer the supernatant to a clean 2 mL Collection Tube. Note: Expect between 400–500 µl of supernatant. Supernatant may still contain some soil particles.
- 7.** Add 250 µl of Solution C2 and vortex for 5 s. Incubate at 2–8°C for 5 min. Note: You can skip the 5 min incubation. However, if you have already validated the DNeasy PowerSoil extractions with this incubation we recommend you retain the step.
- 8.** Centrifuge the tubes for 1 min at 10,000 x g.
- 9.** Avoiding the pellet, transfer up to 600 µl of supernatant to a clean 2 mL Collection Tube.
- 10.** Add 200 µl of Solution C3 and vortex briefly. Incubate at 2–8°C for 5 min. Note: You can skip the 5 min incubation. However, if you have already validated the PowerSoil extractions with this incubation we recommend you retain the step.
- 11.** Centrifuge the tubes for 1 min at 10,000 x g.
- 12.** Avoiding the pellet, transfer up to 750 µl of supernatant to a clean 2 mL Collection Tube.
- 13.** Shake to mix Solution C4 and add 1200 µl to the supernatant. Vortex for 5 s.
- 14.** Load 675 µl onto an MB Spin Column and centrifuge at 10,000 x g for 1 min. Discard flow-through.

- 15.** Repeat step 14 twice, until all of the sample has been processed.
- 16.** Add 500 µl of Solution C5. Centrifuge for 30 s at 10,000 x g.
- 17.** Discard the flow-through. Centrifuge again for 1 min at 10,000 x g.
- 18.** Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 mL Collection Tube. Avoid splashing any Solution C5 onto the column.
- 19.** Add 100 µl of Solution C6 to the center of the white filter membrane. Alternatively, you can use sterile DNA-free PCR-grade water for this step (cat. no. 17000-10).
- 20.** Centrifuge at room temperature for 30 s at 10,000 x g. Discard the MB Spin Column.

The DNA is now ready for downstream applications.

Note: We recommend storing DNA frozen (–20°C to –80°C) as Solution C6 does not contain EDTA.

6.1.4 Monarch® Genomic DNA Purification Kit

PART 1: SAMPLE LYSIS

Animal Tissue

1. Cut tissue into small pieces to ensure rapid lysis and high yields. Weigh the appropriate tissue amount and place in a 1.5 mL microfuge tube (see table below for recommended input amounts). Using more than the recommended amounts will not lead to better yields and/or purity. If using more than recommended is required, split the sample into 2 or more preps. Ensure frozen material remains frozen until samples are mixed with Tissue Lysis Buffer and Proteinase K. Both stabilized and fresh tissue should be kept cold or on ice during preparation.

Tabelle 20: Menge an Material bei verschiedenen Gewebearten (Monarch® Genomic DNA Purification Kit)

<i>Starting material</i>	<i>Recommended input amount</i>
Rodent tail	up to 25 mg
Brain	up to 12 mg
Fibrous tissue (muscle, heart)	up to 25 mg
Ear clips, skin	up to 10 mg
Liver, lung	up to 15 mg
Spleen, kidney	up to 10 mg

2. Add Proteinase K (according to the table below) and 200 µl of Tissue Lysis Buffer to each sample. Mix immediately by vortexing. Ensure tissue particles are able to move freely in the lysis mix and do not remain stuck on the bottom of the tube. When working with multiple samples, prepare a master mix of Tissue Lysis Buffer and Proteinase K to save pipetting steps.

Tabelle 21: Menge an Proteinase K bei verschiedenen Gewebearten (Monarch® Genomic DNA Purification Kit)

<i>Tissue type</i>	<i>Proteinase K amount</i>
Brain, Kidney, Skin, Ear Clips	3 µl
All other tissues	10 µl

3. Incubate at 56°C in a thermal mixer with agitation at full speed (1,400 rpm) until tissue pieces have completely dissolved (typically 30-60 minutes). If time is not limiting, additional incubation up to 3 hours can further improve yields and decrease residual RNA. If an incubator with agitation is not available, use a tube rotator placed

within an incubator, shaking water bath or a heating block (vortex samples every 5-15 minutes to speed up lysis).

4. [Note: The following step can be omitted when working with fresh or frozen tissue amounts <15 mg]. Centrifuge for 3 minutes at maximum speed (>12,000 x g) to pellet debris. Transfer the supernatant to a fresh microfuge tube. This prevents residual debris from clogging the membrane binding sites and helps to reach maximal yield and purity. It is especially important to perform this step if sample appears turbid, contains residual particles, when working with stabilized tissue, or when working with brain or fibrous tissues.

5. Add 3 µl of RNase A to the lysate, vortex thoroughly, and incubate for a minimum of 5 minutes at 56°C with agitation at full speed. This step can be skipped if a low percentage of co-purified RNA will not affect downstream applications.

6. Proceed to step 1 of Part 2: Genomic DNA Binding and Elution.

PART 2: GENOMIC DNA BINDING AND ELUTION

1. Add 400 µl genomic DNA (gDNA) Binding Buffer to the sample and mix thoroughly by pulse-vortexing for 5-10 seconds. Thorough mixing is essential for optimal results.

2. Transfer the lysate/binding buffer mix (~600 µl) to a gDNA Purification Column pre-inserted into a collection tube, without touching the upper column area. Proceed immediately to step 3. Do not reload the same column with more sample; over-exposure of the matrix to the lysed sample can cause the membrane to expand and dislodge. Avoid transferring foam that may have formed during lysis.

3. Close the cap and centrifuge: first for 3 minutes at 1,000 x g to bind the gDNA (no need to empty the collection tube or remove from centrifuge), and then for 1 minute at maximum speed (>12,000 x g) to clear the membrane. Discard the flow-through and the collection tube.

4. Transfer column to a new collection tube and add 500 µl gDNA Wash Buffer. Close the cap and invert a few times so that the wash buffer reaches the cap (do not vortex). Centrifuge immediately for 1 minute at maximum speed, then discard

the flow through. The collection tube can be tapped on a paper towel to remove any residual buffer before reusing it in the next step.

5. Replace the column into the collection tube. Add 500 µl gDNA Wash Buffer and close cap. Centrifuge immediately for 1 minute at maximum speed. Discard the collection tube and flow through.

6. Place the gDNA Purification Column in a DNase-free 1.5 mL microfuge tube (not included). Add 35-100 µl preheated (60°C) gDNA Elution Buffer, close the cap and incubate at room temperature for 1 minute. Elution in 100 µl is recommended, but smaller volumes can be used and will result in more concentrated DNA but a reduced yield (20-25% reduction when using 35 µl). Eluting with preheated elution buffer will increase yields by ~20-40% and eliminates the need for a second elution. The elution buffer (10 mM Tris-Cl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA) offers strong protection against enzymatic degradation and is optimal for long term storage of DNA. However, other low-salt buffers or nuclease-free water can be used if preferred.

7. Centrifuge for 1 minute at maximum speed (> 12,000 x g) to elute the gDNA

6.1.5 NEBNext® Microbime DNA Enrichment Kit

The following protocol will yield 160 µl MBD2-Fc-bound magnetic beads for a 1 µg input sample. For other input sample amounts, scale accordingly.

- 1.** Resuspend NEBNext Protein A Magnetic Beads by gently pipetting the slurry up and down until the suspension is homogeneous. Alternatively, rotate the tube on a rotating mixer gently for 15 minutes at 4°C. Do not vortex.
- 2.** Prepare 1X Bind/wash Buffer on ice by diluting 1 part NEBNext Bind/wash Buffer (5X) with 4 parts DNase-free water. One individual reaction, from start to finish, will require 4 mL of 1X Bind/wash Buffer.
- 3.** In one tube, add 16 µl of MBD2-Fc protein and 160 µl of Protein A Magnetic Beads. For input amounts other than 1 µg, add (0.1 x Y) µl of MBD2-Fc protein and (Y) µl of Protein A magnetic beads. Mix by pipetting up and down until the beads are completely homogeneous, at least 5-10 times.

4. Mix the bead-protein mixture by placing the tube in a rotating mixer for 10 minutes at room temperature.
5. Briefly spin the tube and place on the magnetic rack for 2–5 minutes or until the beads have collected to the wall of the tube and the solution is clear.
6. Carefully remove the supernatant with a pipette without disturbing the beads.
7. Add 1 mL of 1X Bind/wash Buffer (kept on ice) to the tube to wash the beads. Pipette up and down until the beads are completely homogeneous, at least 5-10 times.
8. Mix the beads on a rotating mixer for 3 minutes at room temperature.
9. Briefly spin the tube and place on the magnetic rack for 2–5 minutes or until the beads have collected to the wall of the tube and the solution is clear.
10. Carefully remove the supernatant with a pipette without disturbing the beads.
11. Repeat steps 7–10.
12. Remove the tube from the rack and add 160 μ l of 1X Bind/wash Buffer (kept on ice) to resuspend the beads. For input amounts other than 1 μ g, add (Y) μ l of 1X Bind/wash Buffer to resuspend the beads. Mix by pipetting up and down a few times.

The MBD2-Fc-bound magnetic beads are stable for up to 7 days at 4°C.

Capture Methylated Host DNA

1. Add 1 μ g in up to 200 μ l input DNA to the tube containing the 160 μ l of MBD2-Fc-bound magnetic beads. For other DNA input amounts, add DNA to (Y) μ l of MBD2-Fc bound magnetic beads.
2. Add undiluted Bind/wash Buffer (5X) for a final concentration of 1X. (For example add 10 μ l of Bind/wash Buffer (5X) if the DNA input sample was 40 μ l, add 4 μ l of Bind/wash Buffer (5X) if the DNA sample was 16 μ l). Pipette the sample up and down until the beads are completely homogenous, at least 5-10 times.

3. Volume of 5X Bind/wash Buffer to add (μl) = Vol input DNA (μl)/4
4. Agitate the tube on a rotating mixer for 15 minutes at room temperature with rotation.

Collect Enriched Microbial DNA

1. Briefly spin the tube and place on the magnetic rack for 5 minutes until the beads have collected to the wall of the tube and the solution is clear.
2. Carefully remove the supernatant with a pipette, without disturbing the beads and transfer it to a clean microcentrifuge tube. This supernatant contains the target microbial DNA. Store this sample at -20°C or proceed directly to purification: Purify the samples by either AMPure XP bead clean-up or ethanol precipitation.

Option A: Agencourt[®] AMPure[®] XP/SPRIselect Bead Cleanup

1. Vortex AMPure XP/SPRIselect Beads to resuspend.
2. If your enriched sample volume x 2.8 from the previous step exceeds your tube volume, split into two tubes.
3. Add 1.8X volume of resuspended AMPure XP or SPRIselect beads to the sample. Mix well by pipetting up and down at least 10 times. Be careful to expel all of the liquid out of the tip during the last mix.
4. Incubate samples for at least 5 minutes at room temperature.
5. Place the tube on the appropriate magnetic stand to separate the beads from the supernatant. If necessary, quickly spin the sample to collect the liquid from the sides of the tube or plate wells before placing on the magnetic stand.
6. After 5 minutes (or when the solution is clear), carefully remove and discard the supernatant. Be careful not to disturb the beads that contain DNA targets.
7. Add 400 μl of freshly prepared 80% ethanol to the tube/plate while in the magnetic stand. Incubate at room temperature for 30 seconds, and then carefully remove and discard the supernatant. Be careful not to disturb the beads that contain DNA targets.

8. Repeat Step 7 once for a total of two washes. Be sure to remove all visible liquid after the second wash. If necessary, briefly spin the tube/plate, place back on the magnetic stand and remove traces of ethanol with a p10 pipette tip.
9. Air dry the beads for up to 5 minutes while the tube/plate is on the magnetic stand with the lid open.
10. *Caution:* Do not over-dry the beads. This may result in lower recovery of DNA. Elute the samples when the beads are still dark brown and glossy looking, but when all visible liquid has evaporated. When the beads turn brown and start to crack, they are too dry.
11. Remove the tube from the magnetic stand. Elute the DNA target from the beads by adding 50 μ l of 1X TE (use 25 μ l for each tube if sample was split in two).
12. Mix well by pipetting up and down 10 times. Incubate for at least 2 minutes at room temperature. If necessary, quickly spin the sample to collect the liquid from the sides of the tube or plate wells before placing back on the magnetic stand.
13. Place the tube/plate on the magnetic stand. After 5 minutes (or when the solution is clear), transfer eluate to a new microcentrifuge tube (combine the eluates if sample was split in two).
14. The sample can now be used for NGS library construction or other downstream analysis.

Option B: Ethanol Precipitation

1. Add 2.5 volumes of 100% ethanol, incubate for 10 minutes on ice, then centrifuge the sample for 30 minutes at 13,000 rpm (16,000 rcf). Remove the ethanol, allow the pellet to air dry, and then resuspend the pellet in a small quantity (50 μ l) of TE buffer.
2. If the ethanol pellet contained any residual beads, the resuspended sample can be placed on the magnetic rack 5 minutes to concentrate the beads on the inner wall of the tube, and the supernatant can be transferred to a fresh microcentrifuge tube.

3. The sample can now be used for NGS library construction or other downstream analysis.
4. For ethanol precipitation of the proteinase 1 < digested host DNA also add 0.3 M (final) Na-Acetate.

6.2 PowerBead® Tubes und deren Gewichte

Tabelle 22: Gewichte PowerBead® Tubes (ungefüllt/gefüllt/Differenz)

Nummer	Gewicht [g]		
	leer	mit Probe befüllt	Differenz
1	3,3486	3,4173	0,0687
2	3,2779	3,3419	0,0640
3	3,3663	3,4326	0,0663
4	3,2837	3,3469	0,0632
5	3,3229	3,3863	0,0634
6	3,3479	3,4159	0,0680
7	3,2999	3,3681	0,0682
8	3,2413	3,3082	0,0669
9	3,3269	3,3889	0,0620
10	3,3076	3,3912	0,0836
11	3,3041	3,3681	0,0640
12	3,3618	3,4281	0,0663
13	3,3208	3,3849	0,0641
14	3,2659	3,3321	0,0662
15	3,3187	3,3881	0,0694
16	3,2750	3,3461	0,0711
17	3,2814	3,3380	0,0566
18	3,3508	3,4124	0,0616
19	3,3107	3,3701	0,0594
20	3,2397	3,3047	0,0650
21	3,2821	3,3519	0,0698
22	3,3403	3,4067	0,0664
23	3,3203	3,3817	0,0614
24	3,3285	3,3930	0,0645
25	3,3018	3,3691	0,0673
26	3,3049	3,3436	0,0339
27	3,2852	3,3507	0,0655
28	3,3223	3,3859	0,0636
29	3,2901	3,3549	0,0648
30	3,2756	3,3362	0,0606
31	3,3225	3,3870	0,0645
32	3,2380	3,2959	0,0579
33	3,2715	3,3343	0,0628
34	3,3305	3,3970	0,0665
35	3,2783	3,4510	0,1727
36	3,2994	3,3356	0,0362
37	3,3271	3,3943	0,0672
38	3,2533	3,3179	0,0646
39	3,3430	3,4110	0,0680
40	3,3466	3,4029	0,0563
41	3,2800	3,3389	0,0589
42	3,3506	3,4124	0,0618
43	3,2606	3,3246	0,0640
44	3,2316	3,2976	0,0660

45	3,3393	3,4080	0,0687
46	3,3431	3,4123	0,0692
47	3,3066	3,3734	0,0668
48	3,2506	3,3086	0,0580
49	3,2980	3,3364	0,0356
50	3,2382	3,3295	0,0704
51	3,2830	3,3400	0,0534
52	3,2650	3,3700	0,0645
53	3,2738	3,3853	0,0662
54	3,3010	3,3810	0,0690
55	3,3211	3,3967	0,0642
56	3,3161	3,3950	0,0649
57	3,3242	3,3238	0,0578
58	3,3267	3,4239	0,0070
59	3,3294	3,3082	0,0656
60	3,2607	3,3543	0,0631

6.3 Metadaten der Studie

Tabelle 23: Metadaten

ID	Geschlecht [1 m; 2 w]	Alter bei OP	PAS Score	Alvorado Score	BB [10 ⁹ /L]	CRP [mg/L]	Antibiose vor OP [1 ja; 2 nein]	Makroskopischer Befund Appendix [1 subakut, 2 akut, 3 phlegmonös, 4 gangränös, 5 perforiert]	Schweregrad Appendizitis [1 subakut, 2 akut, 3 phlegmonös, 4 gangränös, 5 perforiert]
1	2	16	5	5	12,45	31,7	2	3	4
2	1	8	7	5	13,22	11,3	2	3	3
3	2	9	4	3	16,96	4,1	2	2	2
4	1	7	9	8	21,8	9,2	2	2	2
5	1	6	6	5	17,54	17	2	3	3
6	2	12	7	7	18,65	2,3	2	3	3
7	1	9	7	7	12,48	35,2	1	3	3
8	1	11	9	9	19,26	66,1	2	5	3
9	1	14	6	6	11,48	7,4	2	2	3
10	2	5	8	6	6,19	138,7	1	5	5
11	1	14	7	6	10,93	13,2	2	3	3
12	1	16	4	4	5,17	24,4	2	3	3
13	1	10	3	3	7,69	14	1	3	3
14	2	14	9	9	19,28	36,7	1	4	5
15	1	16	6	5	9,4	22,7	2	2	3
16	2	16	8	9	19,16	63,7	1	5	5
17	2	11	6	6	9,45	116,7	2	3	4
18	2	12	4	3	9,39	<0,6	2	2	3

19	1	9	7	7	15,02	14,3	2	2	2
20	1	13	6	6	18,21	21,6	2	3	3
21	1	10	7	7	17,79	2,9	2	3	3
22	1	8	9	9	13,66	79,6	2	1	2
23	1	6	10	9	11,37	226,25	1	5	5
24	1	13	8	7	8,06	5,1	2	3	3
25	2	8	5	7	10,44	136	2	1	1
26	1	12	0	0	6,39	0,7	2	2	3
27	1	13	8	9	19,22	3,7	1	5	5
28	1	10	7	8	16,26	137,8	2	2	2
29	1	3	9	9	19,03	55,3	1	5	5
30	1	6	10	10	20,07	13,3	1	3	3
31	1	7	8	7	8,59	59,5	1	3	3
32	1	7	7	6	8,56	10,4	2	3	3
33	1	9	7	7	15,83	1,4	2	3	3
34	1	14	9	8	13,41	108,7	2	1	1
35	2	15	5	4	7,07	<0,6	2	1	2
36	1	14	9	9	13,18	116,9	2	5	5
37	1	14	3	4	5,37	27,7	1	3	3
38	1	10	9	9	20,68	3,4	2	2	3
39	1	8	7	7	15,8	55,8	2	3	3
40	1	12	8	8	18,24	73,2	1	4	3
41	1	13	5	5	9,02	5,08	2	3	3
42	2	4	10	10	21,58	183,3	1	5	3
43	1	10	9	10	12,44	1,4	2	3	3
44	2	10	9	9	12,91	354,2	1	5	4
45	2	13	9	10	15,43	7,2	2	3	3
46	2	13	9	9	19,28	4	1	3	3
47	1	10	3	5	15,63	14,8	1	3	3
48	1	8	8	8	28,82	15,7	1	3	3
49	1	13	5	4	9,87	13,2	2	3	1

50	1	12	8	9	13,39	27,1	2	2	2
51	1	13	8	8	11,2	0	1	3	2
52	1	6	10	10	17,43	145,2	1	5	5
53	2	14	10	10	9,49	31,6	2	2	2
54	1	16	7	8	19,87	0,1	2	2	2
55	1	17	8	9	14,96	8,4	2	3	3
56	1	14	2	2	8,06	15,9	2	3	2
57	2	16	7	7	14	56,4	1	2	2
58	2	5	7	8	27,74	16,1	2	2	1
59	1	12	7	7	10,52	47	2	3	2
60	2	14	3	3	7,29	106,8	2	2	2

6.4 Bakterielle Zusammensetzung der Proben

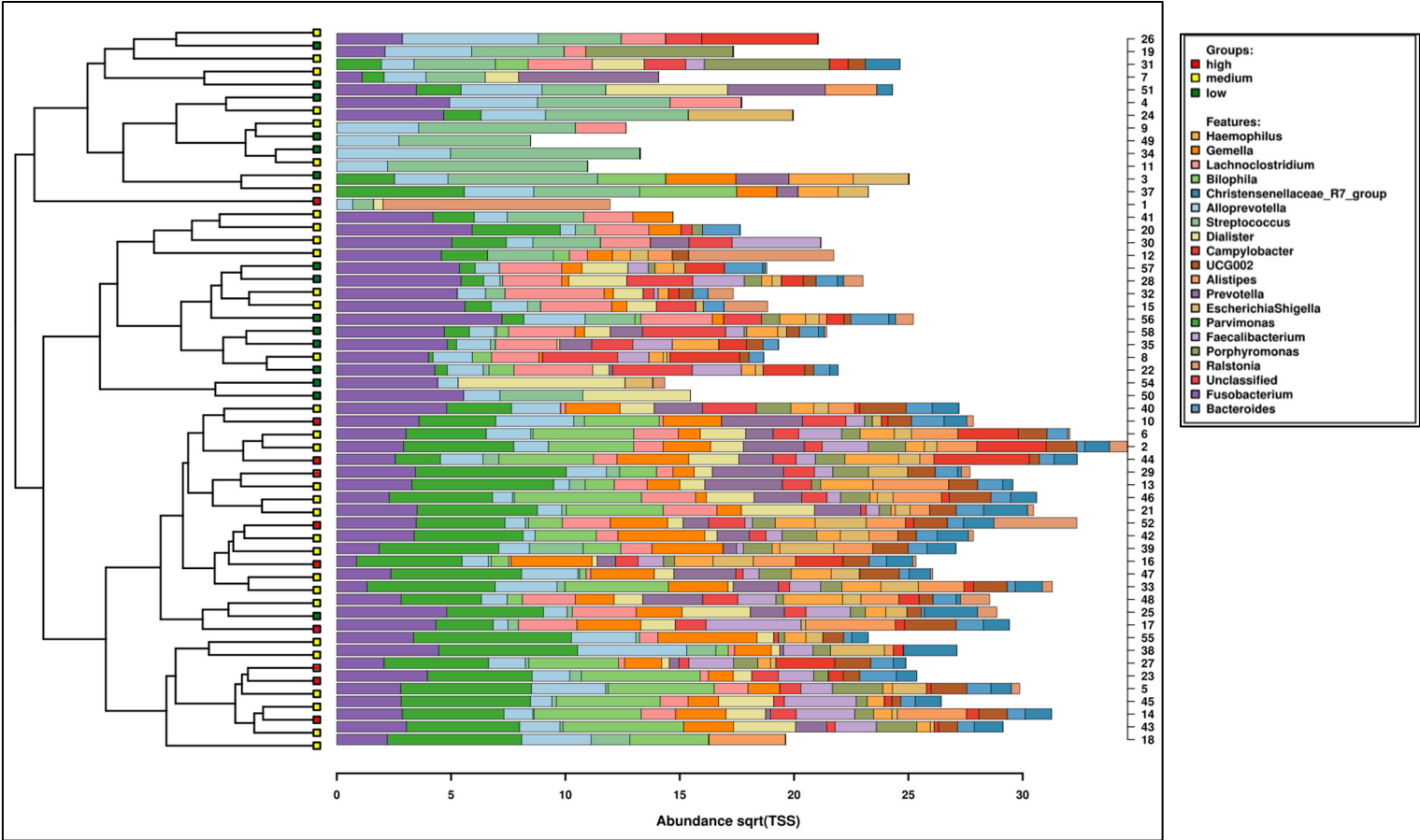


Abbildung 19: Bakterielle Zusammensetzung der einzelnen Proben in Hinsicht auf den Schweregrad der Appendizitis

6.5 Bakteriom und Alvarado-Score

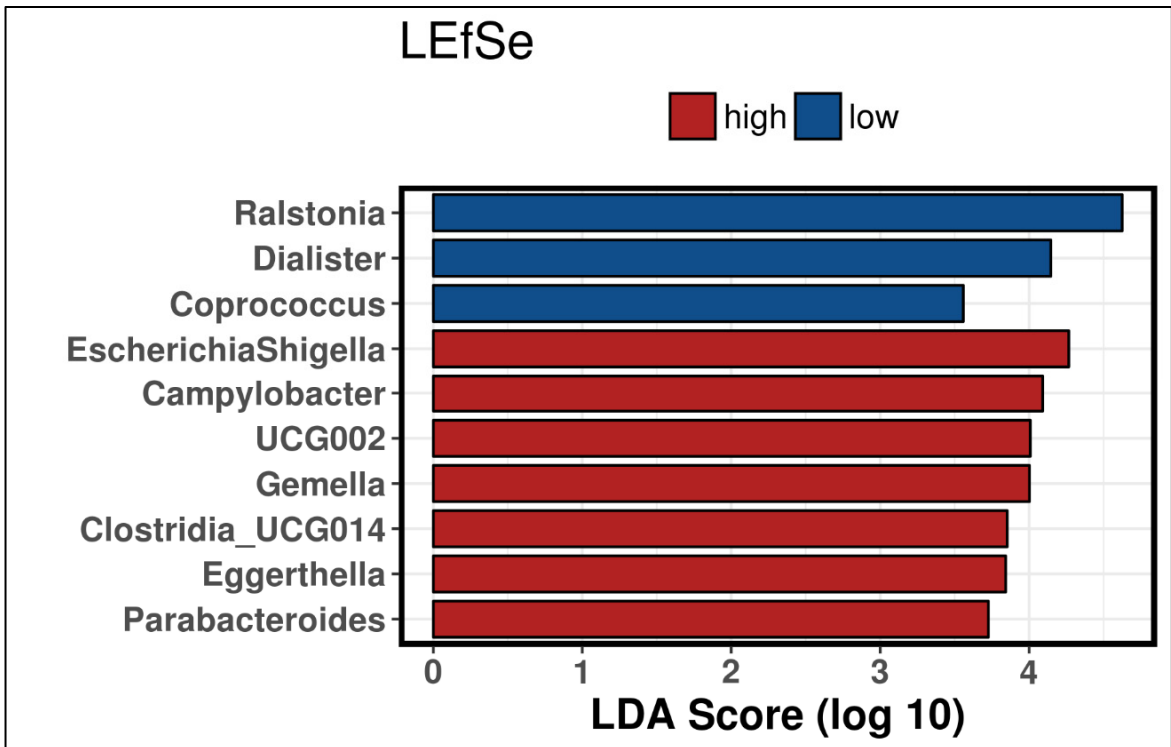


Abbildung 20: Bakteriom und Alvarado-Score (LEfSe-Analyse) auf Gattungsebene; rot: hoher Alvarado-Score („high“; 7 – 10), blau: niedriger Alvarado-Score („low“; 0 – 4)

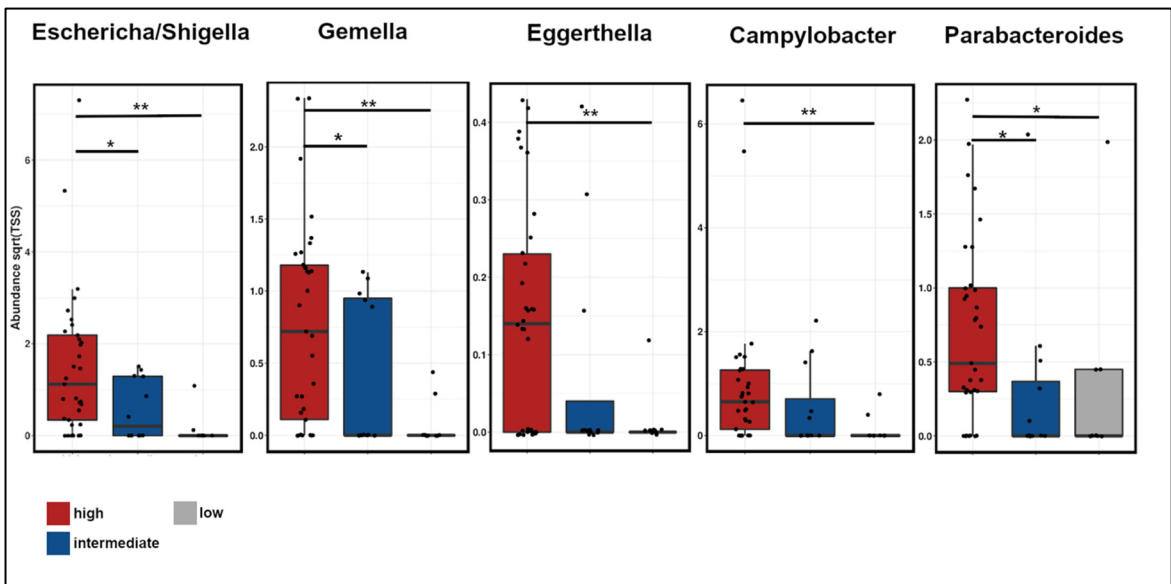


Abbildung 21: Alvarado-Score und Abundanz (Dotplot 2) von *Escherichia/Shigella*, *Gemella*, *Eggerthella*, *Campylobacter* und *Parabacteroides* bei hohem (7 - 10; rot), mittlerem (5 - 6; blau) und niedrigem (0 – 4; grau) Alvarado-Score auf Gattungsebene; ** $0,001 \leq p < 0,01$, * $0,01 \leq p < 0,05$

6.6 Bakteriom und CRP-Wert

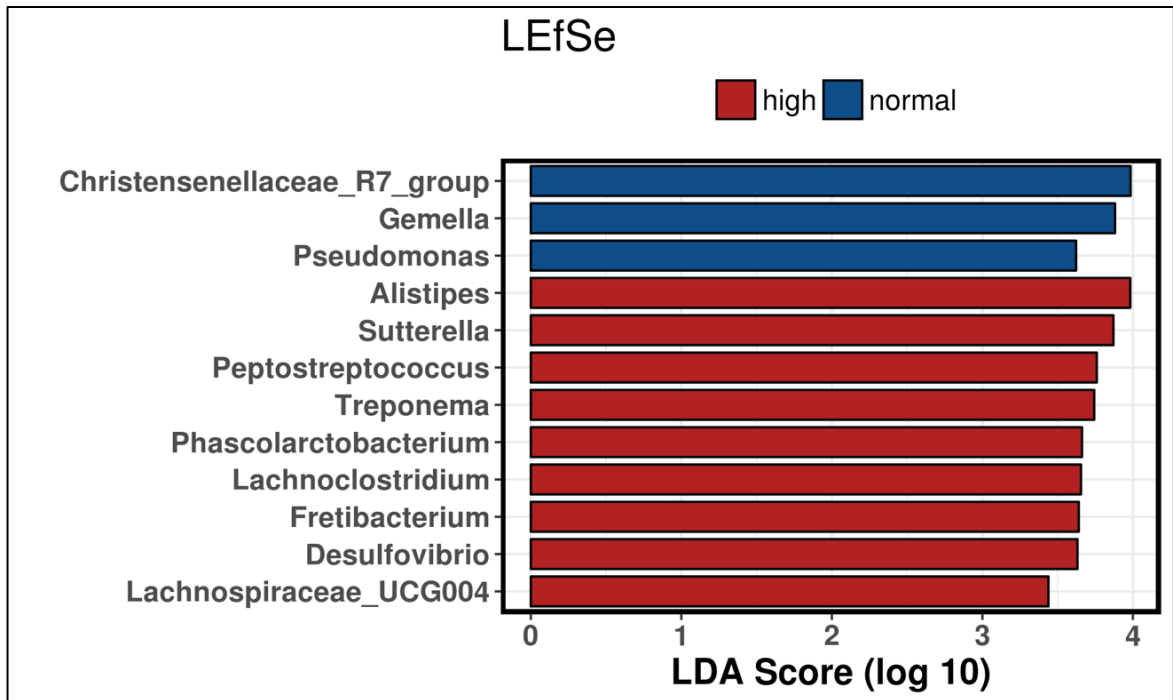


Abbildung 22: Bakteriom und CRP-Wert (LEfSe-Analyse) auf Gattungsebene; rot: hoher CRP-Wert (>40; high), blau: niedriger CRP-Wert (≤ 5 ; low)

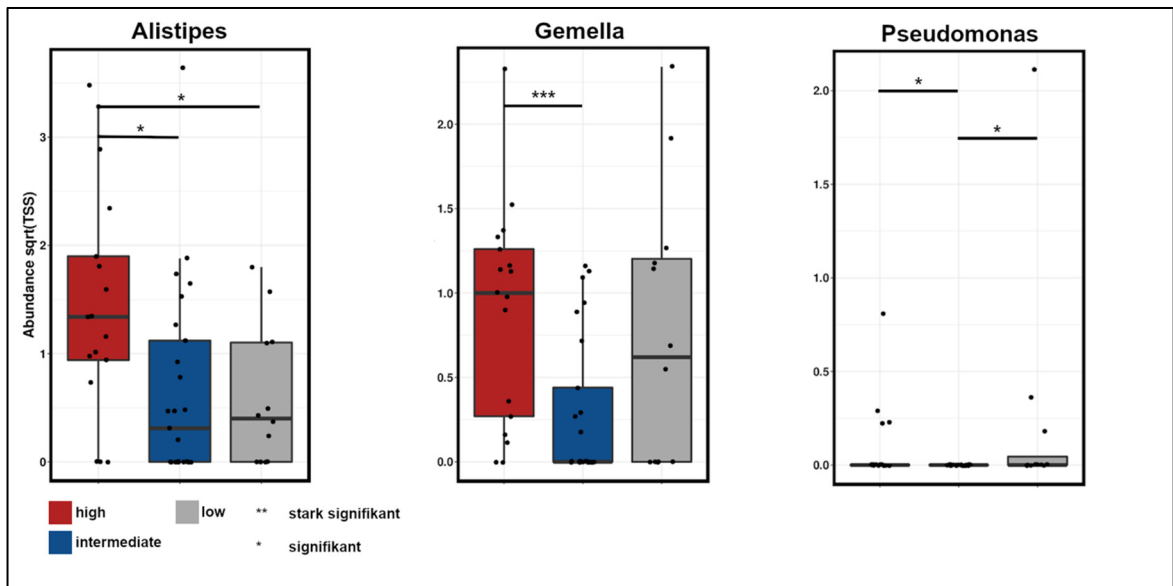


Abbildung 23: CRP-Wert und Abundanz (Boxplot und Dotplot 2) von Alistipes, Gemella und Pseudomonas bei hohem (>40; rot), mittlerem (≤ 40 ; blau) und niedrigem (≤ 5 ; grau) CRP-Wert auf Gattungsebene; *** $p < 0,001$, ** $0,001 \leq p < 0,01$, * $0,01 \leq p < 0,05$