

Alexander Leichtle*

Biomarker – vom Sein und Wesen

Biomarkers – on Being and Essence

DOI 10.1515/labmed-2015-0033

Akzeptanz 13.3.2015

Zusammenfassung: Biomarker, ein inzwischen geradezu inflationär verwendeter Begriff! Während in den vergangenen Jahrzehnten die Bezeichnung „Marker“ vor allem mit Tumorerkrankungen und deren klinisch-chemischer Diagnostik verbunden war, hat die „-omics“-Welle der letzten Dekade eine Unmenge an neuen „Markern“ für alles und jedes in die medizinische Literatur gespült. Insbesondere der unkritische Umgang mit jenen Markern und die Unerfahrenheit derjenigen, die durch neue Techniken in vormalig rein naturwissenschaftlichen Fachgebieten in die Lage versetzt wurden, diese neuen Marker zu messen, haben nicht nur zu einer großen Verunsicherung in Bezug auf die Wertigkeit von Biomarkern an sich, sondern auch zu einer großen Enttäuschung in den wie Strohfeuer aufblühenden „-omics“-Disziplinen geführt. Kaum einer der oft hervorragend publizierten Biomarker hat den Weg in die Klinik gefunden, hochzitierten Wissenschaftlern konnten elementarste Fehler in (Prä-)analytik und Interpretation nachgewiesen werden und selbst die bisher als anerkannt angesehenen „klassischen“ Tumormarker sind vielfach in Misskredit geraten. Zu Unrecht! Denn mit alten wie neuen Markern hat die Labormedizin hervorragende Werkzeuge in der Hand, die, richtig angewandt, nicht nur das Potential haben, die Labordiagnostik zu revolutionieren, sondern auch das Gesicht des Faches verändern werden, weg von einer in vitro quantifizierenden Hilfsdisziplin hin zu einer integrativen und interpretativen Wissenschaft.

Schlüsselwörter: Big Data; Biomarker; -Omics; Probabilistik.

Abstract: “Biomarkers” – now a worn-out buzzword? While the last decades usually associated the term “marker” with malignancies and their diagnostics in clinical chemistry, today’s “-omics” hype has swamped medical literature with vast numbers of new “markers” for any imaginable entity. However, the indiscriminating use of these and the veridancy of those applying them (henceforth enabled to do so by the recent technical evolution in previously purely scientific domains) generated not only a confusing uncertainty about the true value of biomarkers but also deep disappointment in and about the emerging “-omics” disciplines. Hardly any of the frequently high-ranking published biomarkers found its way into clinics, many massively cited researchers were convicted of elementary errors in (pre-) analytics and interpretation, and even the established “classical” tumor markers are now becoming increasingly discredited – though wrongly! For “classical” as well as new markers are excellent tools for laboratory medicine, which, in the right hands, have the potential to revolutionize laboratory diagnostics and to freshen up the face of this academic field, changing from an in vitro quantifying ancillary discipline towards integrative and interpretative science.

Keywords: big data; biomarkers; -omics; probabilistics.

Was sind „Biomarker“?

Diese einfache Frage mag trivial anmuten, die Antwort darauf ist jedoch essentiell, denn die Definition von (Bio-)Markern hat sich in den letzten 15 Jahren grundlegend gewandelt. Als die ersten Tumormarker vor über 30 Jahren in die klinische Diagnostik übernommen wurden, war der Krankheitsbezug noch unmittelbar: Ein Tumor sezerniert eine höhere Konzentration eines „Antigens“ als gesundes Gewebe [1], so dass eine hohe Konzentration des Markers auf die Gegenwart eines entsprechenden Tumors schliessen ließ. Mit dem Aufkommen der neuen

*Korrespondenz: Alexander Leichtle, Universitätsinstitut für Klinische Chemie, Zentrum für Labormedizin, Inselspital – Universitätsklinikum Bern, Bern, Schweiz,
E-Mail: alexander.leichtle@insel.ch

„-omics“-Disziplinen hat sich dieser Begriff zunehmend erweitert. Nun waren nicht mehr einzelne „Antigene“ diagnostisch nutzbar, sondern sog. „Pattern“, also Muster aus unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Moleküle, die zusammen in einem analytischen Lauf gemessen wurden und für die Erstellung eines Pattern noch nicht einmal identifiziert werden mussten. Diese Pattern erreichten für sich allein jedoch selten die diagnostische Trennschärfe der schon etablierten Tumormarker, so dass man sie zur Erzeugung eines diagnostischen Mehrwerts mit den konventionellen Markern kombinierte [2]. Eine genauere Analyse der in den Pattern zusammengefassten Analyten ließ jedoch bald den Schluss aufkommen, dass es sich bei den Analyten nicht nur um tumorspezifische Antigene, sondern häufig um Intermediate tumorspezifischer (proteolytischer) Aktivität handelte, die z.B. bei der Gewinnung von Serum auch in vitro entstehen konnten [3]. Damit war der Schritt getan weg vom eigentlichen „Tumormarker“ hin zum „Surrogatmarker“, der aber nach wie vor als „(Bio-)marker“ bezeichnet wurde. In die gleiche Bresche sprang, nach ersten Enttäuschungen auf dem Gebiet der Proteomics, die ursprünglich schon lange existierende [4], aber durch neue analytische Möglichkeiten (z.B. Massenspektrometrie) neu aufblühende Metabolomics, die ganz explizit tumorspezifische metabolische Intermediate (die ja z.B. bei einer Tumorkachexie mit Fieber auch zu erwarten sind) in den Focus nahm und damit erstmals den Schritt ganz weg vom tumorspezifischen Antigen gewagt hat, wobei auch hier schnell klar wurde, dass ein echter Informationsgewinn wohl nur durch Kombination mit schon etablierten Tumormarkern möglich ist [5, 6]. Die nächste Abstraktionsstufe stellt die Kombination von Pattern aus unterschiedlichen „-omics“-Disziplinen, z.B. Metabolomics und Proteomics und Genomics [7], zu neuen Meta-Markern dar, die an sich wiederum als „Biomarker“ bezeichnet werden können, selbst wenn die komplexen Assoziationen innerhalb dieser Compound-Marker unaufgeklärt bleiben. Weitere Disziplinen bieten sich hier als Kombinationspartner an, z.B. Lipidomics [8], Metagenomics [9], Interactomics [10], CTCs [11], u.v.m.. Die (vorläufig) letzte Hürde der Integration verschiedener Datenquellen wird im Moment durch die seit kurzem auch in die Medizin vorgedrungene „Big Data“-Science [12] übersprungen, bei der nicht nur klassisch analytische Daten, sondern jegliche Datenquelle und Information, die mit dem zu diagnostizierenden Patienten auch nur entfernt verknüpft ist, für die Erstellung eines diagnostischen Profils verwendet wird. Im Gegensatz zu seiner inhaltlichen Evolution ist der Begriff des Biomarkers selbst unverändert geblieben: was damit im Einzelfall gemeint ist, erschließt sich –wenn überhaupt– häufig nur

aus dem Kontext. Eine der Komplexität moderner Marker gerechte Begriffsentwicklung könnte dazu beitragen, dass das Schlagwort „Biomarker“ nicht zu einer leeren Hülse verkommt.

Was macht „Biomarker“ aus?

In gängigen Definitionen werden Biomarker als messbare Entitäten bezeichnet, die sensitiv, spezifisch und ohne Bias die Gegenwart, Progression, oder die Abwesenheit eines Krankheitszustandes oder seines Surrogates bezeichnen [13–15]. Unter diese Definition fallen nicht nur Analyte, die sich in einem klinisch-chemischen Labor messen lassen: vielmehr umfassen diese Entitäten auch Verhältnisse (z.B. Marker-Ratios [16]), Anstiegsgeschwindigkeiten (z.B. beim PSA [17]), Scores [18] oder komplexe Algorithmen [19], die nicht mehr wie ein einzelner Analyt „greifbar“ sind, was die Interpretierbarkeit dahingehend verändert, dass die Assoziation „Marker hoch – Krankheit ausgeprägt“ gerade bei nichtlinearen Modellen unmöglich wird. Dabei bleibt zu beachten, dass komplexe Krankheitsgeschehen unweigerlich mit komplexen Veränderungen im Gesamtorganismus einhergehen (vgl. Tumorkachexie) und jeder Versuch, dieses Geschehen mit einem oder mehreren Markern abzubilden, eine Simplifizierung darstellt, der ein Teil der theoretisch möglichen Gesamtinformation zum Opfer fallen muss [6]. Dazu kommt, dass viele relevante Differentialdiagnosen z.T. ähnliche Veränderungen im betroffenen Patienten auslösen, so dass die Verwendung von immer mehr Markern in Markermodellen dazu führen kann, dass die Spezifität insgesamt abnimmt [6] (vgl. auch „lex parsimoniae“). Zudem sind die Fragestellungen an „Biomarker“ vielfältig: von der Früherkennung über Diagnosesicherung, Verlaufskontrolle, Therapiesteuerung bzw. –wirkungsabschätzung bis zur Prognose reichen die Anforderungen, die ein einziger, für eine Krankheit spezifischer Marker kaum alle simultan erfüllen kann [15]. Derselbe Marker, der für die Früherkennung hervorragend geeignet ist, mag für eine Bestätigungsdiagnostik viel zu unspezifisch, derjenige, der für die Auswahl einer effektiven Therapie am geeignetsten ist, für eine Prognoseabschätzung völlig ungeeignet sein. Überzogene Forderungen an einzelne Marker, z.B. in Bezug auf Sensitivität und Spezifität, können dann dazu führen, dass guten Gewissens keine klaren diagnostischen Aussagen mehr möglich sind und wie im Falle des hochsensitiven Troponins [20] „Graubereiche“ eingeführt werden müssen. In solchen Situationen muss die durch die hohe Sensitivität erkaufte fehlende Spezifität durch einen Derivatmarker, nämlich z.B. die zeitliche

Dynamik des selben Analyten [21], teuer wiedergewonnen werden. Gerade in Multi-Marker-Modellen wird es daher sinnvoll sein, je nach Fragestellung eine unterschiedliche Gewichtung der Einzelkomponenten vorzunehmen, um das Gesamtmodell entsprechend zu optimieren. Ganz klar übersteigt eine solche Anforderung die Ansprüche, die an eine schnelle klinische Nutzbarkeit eines „Biomarkers“ gestellt werden, so dass die Interpretation nicht mehr ausschließlich dem Behandler, sondern vermehrt einem Algorithmus zukommt, der, weil er mit enormen Datenmengen optimiert werden kann, über einen wesentlich größeren spezifischen „Erfahrungsschatz“ als der durch seine zwangsläufig begrenzte und immer subjektive persönliche Erfahrung limitierte Arzt verfügt. Ein zusätzliches Problem stellen Guidelines dar, die mit ihren Empfehlungen, bestimmte Marker zu messen, insbesondere unerfahrene Kollegen dazu verleiten, unkritisch Marker anzufordern, deren Bestimmung z.B. aufgrund der Krankheitsprävalenzen auf spezialisierten Stationen keine Spezifität mehr generieren kann [22], oder deren Bestimmung als „Ausschlussdiagnostik“ zu einer großen Anzahl von „Labordiagnosen“ ohne klare klinische Relevanz (vgl. MGUS nach Serum-Elektrophorese [23]) führt, die im Verlauf belastende Folgediagnostik für die betroffenen Patienten nach sich zieht.

Multi-Marker-Modelle als „Meta-Marker“

Eine bessere diagnostische Trennschärfe als Einzelmarker können, wie schon beschrieben, Multi-Marker-Modelle bieten, die dann als „Meta-Marker“ die gesteigerte Komplexität wiederum in einen einzelnen, klinisch einfach handzuhabenden Wert kondensieren [6]. Doch auch Meta-Marker sind kein diagnostisches Allheilmittel. Neben dem möglichen Spezifitätsverlust im Hinblick auf relevante Differentialdiagnosen ist weder ihre Erstellung noch ihre Interpretation so einfach, wie ihr häufig quantitativer Wert vermuten ließe. So sind Multi-Marker-Modelle häufig sensitiv für „Ausreißer“. Ein klassisches Beispiel ist hier CA 19-9: als Blutgruppenantigen ist es in einem geringen Prozentsatz der Bevölkerung gar nicht vorhanden. In einem multiplikativen Modell muss ein solches fehlendes CA 19-9 folglich zum Totalausfall des Meta-Markers führen, in einer Ratio kann es zur Division durch Null und damit zur Nicht-Berechenbarkeit kommen. Ein weiteres Problem ist der sog. „added value“, der Zusatznutzen [24, 25]. Gute konventionelle Marker decken oft schon einen Großteil der biologischen bzw. pathologischen

Variabilität ab, so dass der Anteil an zusätzlich erklärter Variabilität durch die Addition eines neuen Markers nur noch gering ausfallen kann und mit zunehmender Anzahl weiterer Marker immer weiter abfällt, was häufig auch daran sichtbar wird, dass nicht die besten Einzelklassifikatoren zusammen auch den besten Gesamtklassifikator bilden [5]. Zudem steigt mit zunehmender Anzahl inkludierter Einzelmarker die statistische Wahrscheinlichkeit, in einem Datensatz zufällig einen guten Klassifikator zu finden [26], der sich dann in anderen Kollektiven nicht mehr reproduzieren lässt. Auch das wohl aus Gründen der einfachen Nutzbarkeit häufig verwendete additive Scoring von Markern (z.B. Wert Marker 1 hoch gibt einen Punkt, Wert Marker 2 hoch einen weiteren Punkt) ist kritisch zu betrachten. Ein in vielen Fällen quantitativ gemessener Wert wird zu einer ja/nein-Information reduziert und mehrere solche ja/nein-Entscheidungen zu einem neuen (semi-)quantitativen Wert aufaddiert [27]. Dass bei einem solchen Transformationsprozess eine große Menge der ursprünglich enthaltenen Information verloren geht, ist evident. Eine weitere, für die Beurteilung von Meta-Markern bedeutende Tatsache ist die Möglichkeit, dass in einem Set von Einzelmarkern durchaus unterschiedliche Kombinationen und Gewichtungen eine ähnlich gute Trennschärfe erzielen, d.h. es gibt nicht ein einzelnes, richtiges Modell, und je mehr Einzelkomponenten enthalten sind, desto weniger wahrscheinlich ist es, dass ein einzelnes vorgeschlagenes Modell das einzig richtige ist [28]. Letztendlich muss bei der Erstellung von Meta-Markern ein vernünftiger Ausgleich zwischen dem Zugewinn an Information und dem Verlust an Spezifität und Verallgemeinerbarkeit getroffen werden.

Big data – neue „Super-Marker“?

Die logische Fortführung des Meta-Marker-Ansatzes ist die Einbeziehung aller zu einem Patienten bzw. Krankheitsgeschehen erfassten Daten, z.B. epidemiologische Informationen, apparative Messwerte (z.B. EKG), Bildgebung und vieles mehr – mit dem neuen Schlagwort als „big data“-Ansatz bezeichnet [29]. Auch hier gelten wiederum die gleichen Limitationen wie bei den Meta-Markern: ein Mehr an einbezogener Information ist nicht automatisch ein Mehr an diagnostischer Trennschärfe [30]. Während durch „big data“ die Möglichkeit besteht, bisher unbekannte und aufgrund fehlender computationaler Möglichkeiten unentdeckbare Assoziationen offenzulegen, birgt dieser Ansatz einige Fallstricke: zum einen ist vermutlich für eine spezifische Fragestellung ein Großteil

der erfassten Messpunkte irrelevant, zum anderen trifft man bei „big data“ auf eine ganz neue Datenqualität, die man in der Medizin bislang nicht gewohnt war: unvollständige, möglicherweise auch fehlerhafte Massendaten in unterschiedlichsten Formaten, aus verschiedensten Quellen mit oft unzureichender Verlässlichkeit [31]. Man denke z.B. an das Gewicht eines Patienten, das auf verschiedenen Stationen mit unterschiedlichen Waagen von unterschiedlichen Fachkräften in unterschiedlichen Einheiten handschriftlich erfasst und später für die elektronische Patientenakte digitalisiert wurde. Wie geht man hier mit diskrepanten Werten um? Die Medizin selbst ist keine exakte Wissenschaft, aber das schiere Ausmaß an problematischen Informationen übersteigt das bisher gewohnte Maß an Unschärfe doch deutlich. Der Weg in Richtung „big data“ ist klar und wird auch zweifellos beschritten, die richtige Art des Umgangs damit muss sich in der Medizin aber erst noch etablieren [32]. Die nächsten Jahre werden zeigen, ob neue „big data“-Marker wirklich Super-Marker, oder doch nur ein Super-Hype sind – das Potential zu beidem haben sie.

Probabilistische Interpretation – eine neue Perspektive?

Die rasante Entwicklung neuer „-omics“-Technologien und „big data“ haben nicht nur das Wesen der Biomarker verändert, sondern damit auch ihre Interpretation: Zwar sind die klinischen Fragen zur (Früh-)Diagnose, zur Verlaufskontrolle etc. die gleichen geblieben, dafür haben sich aber die Antwortmöglichkeiten darauf geändert. Während die „-omics“-Technologien durch die enorme Vielzahl ihrer Einzelanalyse den Blick für die analytische Komplexität der Erkrankungen geöffnet haben, kann „big data“ durch die Möglichkeit, bislang unentdeckte Assoziationen scheinbar unzusammenhängender und bisher nie in Kombination betrachteter Daten aus unterschiedlichsten Quellen aufzudecken, eine tiefere Einsicht in die mechanistische Komplexität dieser Krankheiten gewähren [33]. Ist man sich dessen bewusst, müssen „klassische“ Guidelines, die Biomarker mit Cutoffs beschneiden und auch für nichtlineare Markermodelle nur die Wahl zwischen „normal“ und „erhöht“ lassen, als geradezu primitiv erscheinen. Auch in der Medizin ist (abgesehen von wenigen Ausnahmen) die Welt nicht schwarz und weiß, sondern in unterschiedlichen Schattierungen grau: Ein Biomarker-Wert kann vor dem einen (z.B. genetischen) Hintergrund erniedrigt, vor einem anderen erhöht erscheinen, und für die Extremfälle braucht man

vermutlich noch nicht einmal einen Biomarker, sondern lediglich ein aufmerksames Auge. In den interessanten, differentialdiagnostisch relevanten Bereichen, sind eindeutige, dichotome Aussagen wie „krank“ oder „nicht krank“ anhand eines Biomarkers allein kaum zu treffen. Eine Lösung bietet sich hier mit probabilistischen Ansätzen an [34–37], die in der Diagnostik jedoch noch wenig etabliert sind, vermutlich auch deshalb, weil die klinisch tätigen Kollegen im Umgang damit noch nicht geübt sind und unter Umständen sogar die Folgen fürchten. Eine derartige Antwort wäre dann nicht einfach: *Über dem Cutoff, also krank!* sondern, da die Krankheit zwar objektiv entweder vorhanden oder nicht vorhanden ist, ihr labordiagnostisches Surrogat aber ein Kontinuum darstellt, z.B.: *bei diesem Wert ist die Wahrscheinlichkeit, krank zu sein größer als die, gesund zu sein.* Solche Antworten führen jedoch nicht zu simplen Handlungsanleitungen, wie sie auch in vielen diagnostischen Pfaden präsentiert werden, sondern verlagern die Verantwortung für z.B. eine therapeutische Entscheidung vom Biomarker als „objektivem“ Kriterium zurück in die Hände des behandelten Arztes bzw. sogar in die des Patienten, der für sich definieren muss, ab welchem Wahrscheinlichkeitsgrad für ihn selbst eine ggf. belastende Therapie in Frage kommt [38]. Medizinische Entscheidungen werden bei solchen, auf Wahrscheinlichkeiten beruhenden Biomarker-Aussagen sicher ausgewogener, aber nicht einfacher. In Zukunft werden uns die Algorithmen [39], die uns bisher bei der Erstellung von komplexen Biomarkern geholfen haben, auch eine Hilfestellung bei der optimalen Entscheidungsfindung und damit einen echten diagnostischen Mehrwert bieten können.

Interessenkonflikt: Der Autor erklärt, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

Literatur

1. Hori SS, Gambhir S S. Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations. *Sci Transl Med* 2011;3:109ra116.
2. Fiedler GM, Leichte AB, Kase J, Baumann S, Ceglarek U, Felix K, et al. Serum peptidome profiling revealed platelet factor 4 as a potential discriminating peptide associated with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3812–9.
3. Villanueva J, Shaffer DR, Philip J, Chaparro CA, Erdjument-Bromage H, Olshen AB, et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 2006;116:271–84.
4. Warburg O. über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *J Mol Med* 1925.

5. Leichtle AB, Nuoffer J-M, Ceglarek U, Kase J, Conrad T, Witzgmann H, et al. Serum amino acid profiles and their alterations in colorectal cancer. *Metabolomics* 2012;8:643–53.
6. Leichtle AB, Ceglarek U, Weinert P, Nakas CT, Nuoffer J-M, Kase J, et al. Pancreatic carcinoma, pancreatitis, and healthy controls: metabolite models in a three-class diagnostic dilemma. *Metabolomics* 2013;9:677–87.
7. Nkuipou-Kenfack E, Duranton F, Gayraud N, Argilés À, Lundin U, Weinberger KM, et al. Assessment of metabolomic and proteomic biomarkers in detection and prognosis of progression of renal function in chronic kidney disease. *PLoS ONE* 2014;9:e96955.
8. Rolim AE, Henrique-Araújo R, Ferraz EG, de Araújo Alves Dultra FK, Fernandez LG. Lipidomics in the study of lipid metabolism: Current perspectives in the omic sciences. *Gene* 2015;554:131–9.
9. Zeller G, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol* 2014;10:766.
10. Tsoi LC, Elder JT, Abecasis GR. Graphical algorithm for integration of genetic and biological data: proof of principle using psoriasis as a model. *Bioinformatics* 2014;30:799–804. doi:10.1093/bioinformatics/btu799.
11. Pesta M, Kulda V, Narsanska A, Fichtl J, Topolcan O. May CTC technologies promote better cancer management? *EPMA J* 2015;6:1.
12. McIntyre RS, Cha DS, Jerrell JM, Swardfager W, Kim RD, Costa LG, et al. Advancing biomarker research: utilizing ‘Big Data’ approaches for the characterization and prevention of bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2014;16:531–47.
13. Diamandis E. Cancer biomarkers: Can we turn recent failures into success?. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2010;102:1449.
14. Ziegler A, Koch A, Krockenberger K, Grosshennig A. Personalized medicine using DNA biomarkers: a review. *Hum Genet* 2012;131:1627–38.
15. Leichtle AB, Dufour J-F, Fiedler GM. Potentials and pitfalls of clinical peptidomics and metabolomics. *Swiss Med Wkly* 2013;143:w13801.
16. Münzker J, Hofer D, Trummer C, Ulbing M, Harger A, Pieber T, et al. Testosterone to Dihydrotestosterone Ratio as a New Biomarker for an Adverse Metabolic Phenotype in the Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:653–60.
17. Antonarakis ES, Zahurak ML, Lin J, Keizman D, Carducci MA, Eisenberger MA. Changes in PSA kinetics predict metastasis-free survival in men with PSA-recurrent prostate cancer treated with nonhormonal agents: combined analysis of 4 phase II trials. *Cancer* 2012;118:1533–42.
18. Van Hemelrijck M, Eichholzer M, Faeh D, Rohrmann S. Ability of a biomarker-based score to predict death from circulatory disease and cancer in NHANES III. *BMC Public Health* 2012;12:895.
19. Han H, Jiang X. Overcome support vector machine diagnosis overfitting. *Cancer Inform* 2014;13:145–58.
20. Lee HM, Kerr D, O’Hara D, Kelly A-M. Clinical significance of initial troponin I in the grey zone in emergency department chest pain patients: a retrospective pilot study. *Emerg Med J* 2010;27:302–4.
21. Than M, Cullen L, Aldous S, Parsonage WA, Reid CM, Greenslade J, et al. 2-Hour accelerated diagnostic protocol to assess patients with chest pain symptoms using contemporary troponins as the only biomarker: the ADAPT trial. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:2091–8.
22. Quinn DA, Fogel RB, Smith CD, Laposata M, Taylor Thompson B, Johnson SM, et al. D-dimers in the diagnosis of pulmonary embolism. *Am. J Respir Crit Care Med* 1999;159:1445–9.
23. Fouquet G, Amouzou K, Renaud L, Carpentier B, Simonnet A, Van de Wyngaert Z, et al. Les gammopathies monoclonales de signification indéterminée ne nécessitent pas systématiquement un recours à une consultation spécialisée. *Rev Med Interne* 2014. doi:10.1016/j.revmed.2014.10.366.
24. Boulesteix AL, Sauerbrei W. Added predictive value of high-throughput molecular data to clinical data and its validation. *Brief Bioinformatics* 2011;12:215–29.
25. Steyerberg EW, Pencina MJ, Lingsma HF, Kattan MW, Vickers AJ, Van Calster B. Assessing the incremental value of diagnostic and prognostic markers: a review and illustration. *Eur J Clin Invest* 2012;42:216–28.
26. Jørgensen LG, Brandslund I, Petersen PH. Should we maintain the 95 percent reference intervals in the era of wellness testing? A concept paper. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:747–51.
27. Tabak YP, Sun X, Nunez CM, Johannes RS. Using electronic health record data to develop inpatient mortality predictive model: Acute Laboratory Risk of Mortality Score (ALaRMS). *J Am Med Inform Assoc* 2014;21:455–63.
28. Hoeting JA, Raftery AE, Madigan D. Bayesian variable and transformation selection in linear regression. *J Comput Graph Stat* 2002;11:485–507.
29. Khoury MJ, Ioannidis JP. Medicine. Big data meets public health. *Science* 2014;346:1054–5.
30. Hothorn T. «Big Data» – grosse Daten, viel Wissen? *PRAXIS* 2015;104:131–5.
31. Iwashyna TJ, Liu V. What’s so different about big data?. A primer for clinicians trained to think epidemiologically. *Annals ATS* 2014;11:1130–5.
32. Murdoch TB, Detsky AS. The inevitable application of big data to health care. *J Am Med Assoc* 2013;309:1351–2.
33. Jiang P, Liu XS. Big data mining yields novel insights on cancer. *Nat Genet* 2015;47:103–4.
34. Vickers A. Decision analysis for the evaluation of diagnostic tests, prediction models, and molecular markers. *The American Statistician* 2008;62:314–20.
35. Savoca R. Interpretation von Laborresultaten – Bayes oder Bauchgefühl? *Pipette* 2013;3:10–11.
36. Ashby D. Bayesian statistics in medicine: a 25 year review. *Statist Med* 2006;25:3589–3631.
37. Sakhanenko NA, Galas DJ. Probabilistic logic methods and some applications to biology and medicine. *J Comput Biol* 2012;19:316–36.
38. Costello F, Watts P. Surprisingly rational: probability theory plus noise explains biases in judgment. *Psychol Rev* 2014;121:463–80.
39. Winslow RL, Trayanova N, Geman D, Miller MI. Computational medicine: translating models to clinical care. *Sci Transl Med* 2012;4:158rv11.