



## Raccomandazioni 2025 per l'esecuzione di Test Molecolari su Biopsia Liquida in Oncologia

**Edizione 2025:** Aggiornata a Dicembre 2025

A cura del Gruppo di Lavoro: **AIOM - SIAPeC-IAP - SIBIOC - SIF**



Società Italiana di Anatomia Patologica  
e Citologia Diagnostica - Divisione Italiana  
della International Academy of Pathology



## Estensori

### Coordinatore:

Antonio Russo – AIOM - Dipartimento di Medicina di Precisione in Area Medica, Chirurgica Critica (Me.Pre.C.C.), Università di Palermo

### Componenti del panel di esperti:

Giordano Beretta	<b>AIOM</b>	Dipartimento Onco-ematologico, UO Oncologia Medica - ASL Pescara, Presidio Ospedaliero Pescara
Ettore Capoluongo	<b>SIBioC</b>	Dipartimento di Eccellenza in Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli; UOC Patologia Clinica, Ospedale San Giovanni Addolorata, Roma
Romano Danesi	<b>SIF</b>	Dipartimento di Oncologia ed Emato-oncologia Università "La Statale", Milano
Marzia Del Re	<b>SIF</b>	Saint Camillus International University of Medical and Health Sciences, Roma
Matteo Fassan	<b>SIAPEC/IAP</b>	Università degli Studi di Padova; Istituto Oncologico Veneto (IOV) IRCCS, Padova
Giuseppe Giuffrè	<b>SIAPEC/IAP</b>	Dipartimento di Patologia Umana dell'adulto e dell'età evolutiva "Gaetano Barresi" Università degli Studi di Messina
Stefania Gori	<b>AIOM</b>	IRCCS Ospedale Don Calabria-Sacro Cuore di Negrar, Verona
Valerio Gristina	<b>AIOM</b>	Dipartimento di Medicina di Precisione in Area Medica, Chirurgica Critica (Me.Pre.C.C.), Università di Palermo
Lorena Incorvaia	<b>AIOM</b>	Dipartimento di Medicina di Precisione in Area Medica, Chirurgica Critica (Me.Pre.C.C.), Università di Palermo
Umberto Malapelle	<b>SIAPEC/IAP</b>	Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi Federico II, Napoli
Antonio Marchetti	<b>SIAPEC/IAP</b>	Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti – Pescara
Nicola Normanno	<b>AIOM</b>	IRCCS Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori (IRST) "Dino Amadori", Meldola – Forlì Cesena
Carmine Pinto	<b>AIOM</b>	Dipartimento di Oncologia e Tecnologie Avanzate in Oncologia AUSL- IRCCS di Reggio Emilia
Andrea Sartore-Bianchi	<b>AIOM</b>	Dipartimento di Oncologia ed Emato-Oncologia Università degli Studi di Milano (La Statale), Milano
Nicola Silvestris	<b>AIOM</b>	IRCCS Istituto Tumori "Giovanni Paolo II", Bari
Pierosandro Tagliaferri	<b>AIOM</b>	Università Magna Graecia, Catanzaro

Giancarlo Troncone	<b>SIAPEC/IAP</b>	Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi Federico II, Napoli
Saverio Cinieri	<b>AIOM</b>	Ospedale Sen. Antonio Perrino, Brindisi
Daniele Santini	<b>AIOM</b>	Dipartimento di Scienze e Biotechnologie Medico-Chirurgiche, Università Degli Studi Di Roma "La Sapienza"

## Glossario

cfDNA: circulating cell free DNA

ctDNA: circulating (cell free) tumor DNA

VAF: variant allele frequency

MAF: mutant allele frequency

CHIP: clonal hematopoiesis of indeterminate potential

PBMNC: peripheral blood mononuclear cells

SNV: single nucleotide variant

CNV: copy number variation

UMI: unique molecular identifiers



# 1. Biopsia liquida

## 1.1 Definizione

La biopsia liquida è un termine utilizzato per indicare un esame di laboratorio eseguito su un campione di sangue, urina o altri fluidi biologici finalizzato alla ricerca in circolo di cellule di origine tumorale (CTCs), microRNA (miRNA), le piastrine, le vescicole extracellulari (EVs) o altre molecole rilasciate dalle cellule tumorali nei fluidi corporei del paziente (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy>).


Con il termine biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici come surrogato al tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili ai fini diagnostici, prognostici o predittivi ai fini della selezione dei pazienti oncologici al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare.

L'applicazione di maggiore interesse clinico è rappresentata dalla possibilità di valutare il profilo mutazionale del DNA tumorale circolante (*circulating tumor DNA*, ctDNA) che rappresenta un'esigua frazione del DNA libero circolante (*circulating cell free DNA*, cfDNA), isolato da sangue periferico. La ricerca di alterazioni molecolari a carico dei biomarcatori predittivi di risposta al trattamento in biopsia liquida richiede piattaforme analitiche caratterizzate da elevata sensibilità e specificità per identificare alterazioni poco rappresentate nel torrente circolatorio. A causa della scarsa abbondanza del ctDNA nel torrente circolatorio, la presenza di DNA di origine tumorale è confermata solamente quando una mutazione driver e/o oncogenica viene rilevata. In questo contesto, il parametro per misurare l'abbondanza dell'allele mutato è la *variant allele frequency* (VAF), che indica il valore percentuale calcolato dividendo il numero di frammenti di DNA portatori dell'alterazione specifica per il numero totale di frammenti di DNA analizzati in quel specifico locus.

## 1.2 Vantaggi della biopsia liquida

La biopsia liquida presenta alcuni evidenti vantaggi rispetto alla biopsia tissutale, ed in particolare:


- la procedura non è invasiva, in quanto si tratta di un semplice prelievo di sangue pressoché privo di complicanze specifiche per il paziente;

- 
- prelievi seriali di campioni di sangue periferico possono essere collezionati longitudinalmente per monitorare l'evoluzione molecolare della malattia, sebbene non esista ad oggi evidenza che indirizzi a modificare la scelta terapeutica, in assenza di progressione clinico-strumentale di malattia;
  - permette di superare le criticità legate all'eterogeneità molecolare della neoplasia rispetto alla biopsia tissutale in quanto nello stesso campione di fluido può essere presente ctDNA derivante da diverse aree di uno stesso tumore e dalle differenti sedi di malattia (Watanabe *et al.*, 2021).

### 1.3 Problematiche della biopsia liquida

L'impiego della biopsia liquida nel management clinico del paziente oncologico è limitato da alcune problematiche di natura biologica ed analitica che ne riducono l'accuratezza diagnostica. Le limitazioni di maggior rilievo sono rappresentate da:

- “falsi negativi” strettamente dipendenti dalla scarsa abbondanza di ctDNA nel torrente circolatorio in funzione della localizzazione, del volume e della variabilità nello *shedding* di materiale genetico in circolo, e del timing in cui è stato effettuato il prelievo. Alte quantità di ctDNA sono riscontrate prevalentemente nelle seguenti condizioni:
  - Alto carico di malattia;
  - Localizzazioni viscerali;
  - Elevato indice di proliferazione delle cellule tumorali;
  - Basso indice fibrotico, cioè quantità bassa di tessuto connettivo in rapporto alla cellularità tumorale (Watanabe *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).
- “falsi positivi” causati dalla scelta di pipeline bioinformatiche non congruenti con la rilevanza clinica delle alterazioni molecolari o da varianti derivanti da ematopoiesi clonale.
- presenza di varianti germinali che richiedono l'attivazione del *counseling* genetico per rintracciare nella famiglia eventuali alterazioni che predispongono a patologie neoplastico-sindromiche.
- scelta della sorgente biologica da cui estrarre l'analita di interesse (sangue intero, urine, saliva, liquido cefalorachidiano, washing peritoneale, pleurico...)
- problematiche pre-analitiche, analitiche e post-analitiche legate alla gestione ed analisi del campione biologico e all'interpretazione dei dati molecolari.




Le varianti rilevate nel ctDNA possono includere varianti germinali e varianti somatiche provenienti da cellule ematiche o altri tessuti non neoplastici che fisiologicamente rilasciano frammenti di DNA nel sangue. Una componente importante da discriminare nel corso dell'analisi è rappresentata dalla presenza di mutazioni attribuibili alla *clonal hematopoiesis of indeterminate potential* (CHIP), che possono interferire con la rilevazione di alterazioni molecolari di origine neoplastica. Studi hanno dimostrato che oltre il 25% delle mutazioni nel sangue periferico può essere attribuito a CHIP e quasi la metà di queste sono in oncogeni (Brown et al., 2025; Chen & Zhao, 2019; Esposito Abate et al., 2019; Hu et al., 2018; Rachiglio et al., 2016).

Tali mutazioni coinvolgono più frequentemente i geni *CHEK2*, *ATM*, *TP53*, *PLB2*, *CDK12*, *BRAF* e *BRCA1/2* (Brown et al., 2025) e si verificano nelle cellule staminali ematopoietiche, conferendo un vantaggio competitivo per guidare l'espansione clonale (Jaiswal, 2020) (Hu et al., 2018). L'ematopoiesi clonale è un processo in cui le cellule staminali/progenitrici emopoietiche acquisiscono mutazioni somatiche che vengono rilevate nel sangue. Queste varianti sono associate all'avanzare dell'età e all'abitudine al fumo e sono più frequentemente riscontrate in pazienti con malattie cardiovascolari, ictus ischemico e neoplasie ematologiche. È necessario distinguere la CHIP perché costituisce un rischio reale di falsi positivi quando si analizza il cfDNA.

Con l'analisi del ctDNA, le varianti di origine germinale tendono a presentare valori di VAF caratteristici: circa il 50% (generalmente nel range 40–60%) per le varianti eterozigoti e prossimi al 100% per le varianti omozigoti/emi-zigoti. Al contrario, le varianti somatiche identificate nel ctDNA mostrano nella maggior parte dei casi VAF inferiori, spesso <40%, in quanto presenti solo in una quota delle cellule tumorali e diluite nel cfDNA di origine non neoplastica (Stout LA et al., 2021).

In particolare, VAF somatiche >50% possono essere rilevate in pazienti con elevata carico di malattia dove la quota di ctDNA in circolo è massiva o in loci genomici amplificati. In questo contesto, per la rilevazione di mutazioni ad elevato impatto clinico è necessaria la consapevolezza di intercettare ed identificare potenzialmente varianti germinali, soprattutto nei geni comuni associati alla predisposizione ereditaria al cancro (ad esempio, *APC*, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *KIT*, *MLH1*, *NF1*, *PTEN*, *RB1*, *RET*, *SMAD4*, *STK11*, *TP53*, *TSC1* e *VHL*) diventando imprescindibile ai fini dell'inquadramento clinico del paziente oncologico (Lockwood et al., 2023).



**In evidenza:** per escludere falsi positivi/negativi nella valutazione del risultato dell'analisi, deve essere posta particolare attenzione all'individuazione delle varianti germinali (*APC, ATM, BRCA1, BRCA2, KIT, MLH1, NF1, PTEN, RB1, RET, SMAD4, STK11, TP53, TSC1* e *VHL*) e quelle associate a CHIP (*CHEK2, ATM, TP53, PLB2, CDK12, BRAF, BRCA1/2*).

## 1.4 Il percorso analitico

Il percorso analitico finalizzato all'analisi del ctDNA per la rilevazione di alterazioni molecolari di interesse clinico richiede procedure analitiche ottimizzate per incrementare l'affidabilità clinica dell'analisi molecolare. La concentrazione del ctDNA dal plasma è molto spesso limitata (in media 1-10 ng/ml in individui asintomatici), per questo motivo alcune fasi nei processi pre-analitici, analitici e post-analitici risultano essere cruciali e devono essere oggetto di particolare attenzione. Il ctDNA presenta un'emivita di 15 minuti una volta prelevato dal torrente circolatorio, mentre il cfRNA risente di una più marcata instabilità tale da non consentire la valutazione dell'emivita.

### 1.4.1 Fase pre-analitica


La fase pre-analitica copre tutte le procedure operative che intercorrono dalla raccolta del campione alla preparazione dell'analita per affrontare l'analisi molecolare e deve essere eseguita controllando ogni singolo passaggio in modo da preventivamente eliminare qualsiasi fattore di rischio che possa inficiare la valutazione molecolare.

Gli step cruciali della fase pre-analitica si distinguono in:

- modalità e tempo della raccolta, processazione e conservazione del campione
- isolamento del cfDNA

#### 1.4.1.1 Modalità e tempo della raccolta, processazione e conservazione del campione

Il cfDNA può essere isolato dal siero o dal plasma, quest'ultimo da preferire rispetto al siero poiché il processo di coagulazione può causare il rilascio di DNA genomico derivante dai leucociti, abbattendo la già esigua quota di ctDNA in cui è possibile rilevare un'alterazione molecolare driver per la stratificazione clinica del paziente oncologico. Ad oggi, non esistono al momento indicazioni sulla quantità di sangue da impiegare ai fini diagnostici, anche se è raccomandato isolare il cfDNA da almeno 2 ml di plasma. Il gruppo di Patologia Molecolare e Medicina di Precisione (PMMP) in seno alla SIAPEC sta lavorando per standardizzare l'optimum



di sangue intero da collezionare ai fini delle caratterizzazioni molecolari (14-20 ml di sangue). Il prelievo di sangue può essere raccolto in tubi standard K2- o K3-EDTA oppure impiegando tubi contenenti speciali fissativi, in grado di stabilizzare il cfDNA dai 3 ai 7 giorni (es. PAXgene Blood ccfDNA Tubes, Streck Cell-Free DNA BCT Tubes, Roche Diagnostics Cell-Free DNA Collection Tubes) a temperature controllate (16-24h dal prelievo) (Alidousty et al., 2017).

Se il prelievo è effettuato utilizzando provette standard (es. K-EDTA), il plasma contenente cfDNA deve essere separato entro 1–2 ore dal prelievo per evitare la lisi leucocitaria e la contaminazione da DNA genomico, che possono ridurre la frazione di cfDNA tumorale e aumentare il tasso di falsi negativi. Diversi studi hanno dimostrato che, superate le 3 ore dal prelievo, si può verificare una lisi delle cellule mononucleate periferiche (PBMNC) con conseguente rilascio di DNA nucleare riducendo significativamente la possibilità di rilevare eventuali alterazioni molecolari di interesse clinico nel campione biologico che determina una diluizione del DNA tumorale.

Per l'eliminazione dei residui cellulari e per ottenere un campione idoneo alle successive analisi, il plasma deve essere isolato mediante centrifugazione, assicurandosi di aver completamente allontanato il contaminante leucocitario derivante dal *buffy coat*. Esistono diversi protocolli di centrifugazione: è consigliabile eseguire una prima centrifugazione a bassa velocità (1200-1600 g) per evitare la lisi dei leucociti ed una successiva centrifugazione del sopranatante a elevata velocità ( $\geq 3000$  g) per rimuovere tutti i contaminanti a temperatura controllata (4°C) ed evitare fenomeni litici a causa delle elevate temperature.

Il plasma ottenuto può essere conservato a -20°C per brevi periodi (circa 1 mese) o, per periodi più prolungati, a -80°C, temperatura che garantisce una maggiore stabilità del cfDNA. Nel caso in cui venga richiesta l'analisi simultanea del cfDNA e del cfRNA è mandatoria la conservazione del campione a -80°C anche per periodi brevi. Tuttavia, all'aumentare del periodo di conservazione diminuisce la quantità totale di cfDNA e cfRNA che è possibile estrarre, soprattutto se il campione dovesse essere sottoposto a cicli di congelamento e scongelamento (Danesi et al., 2021).

**In evidenza:** 1) Utilizzare provette da emocromo (K-EDTA) o dedicate per l'isolamento del cfDNA e del cfRNA ; 2) conservare il sangue periferico a +4°C per non più di 1 ora (provette standard) o per periodi maggiori (fino a 7 giorni) in provette dedicate (verificare istruzioni specifiche); 3) effettuare due step consequenziali di centrifughe per evitare lisi PBMNC e raccogliere almeno 2 ml plasma; 4) conservare a -20°C o -80°C (preferibilmente) a seconda dell'intervallo temporale che precede la purifica del cfDNA (entro 24 ore è possibile preservare il cfDNA a -20°C ) prima dell'estrazione.



### 1.4.1.2 Estrazione

Per l'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici circolanti da plasma e da fluidi biologici sono oggi disponibili vari dispositivi commerciali sviluppati e validati per massimizzare la quota di ctDNA nel volume di cfDNA estratto (Perez-Barrios et al., 2016; Wang et al., 2021). Questi kit sfruttano principi fisico-chimici (colonnine con membrane di silice, biglie magnetiche) per isolare e catturare acidi nucleici da fluidi biologici permettendo l'isolamento del cfDNA a partire da un minimo di 10 µl a un massimo di 10 ml di plasma. In generale, si ritiene che 2 ml di plasma siano la quantità minima necessaria in grado di fornire risultati accurati utilizzando le diverse metodiche di estrazione. Inoltre, la maggior parte dei kit sopra citati consente di concentrare l'eluato in un volume variabile (20-150 µl).


Una volta estratto, il cfDNA può essere sottoposto a quantificazione e qualificazione per conoscere lo spettro di lunghezza dei frammenti contenuti all'interno del campione biologico, in modo da ottimizzare il processo di analisi e garantire solidità nell'analisi del profilo molecolare. L'accuratezza nella fase di quantificazione può essere ottenuta ad esempio con sistemi di elettroforesi capillare (es. Agilent TapeStation). In generale, i kit di estrazione sopra citati consentono di ottenere campioni di cfDNA di alta qualità e con una concentrazione superiore a 5 ng/ml.

La conservazione ottimale del cfDNA consente di eseguire ulteriori indagini molecolari *post-storage* del materiale, previo esplicito consenso informato da parte del paziente. Il processo richiede una strumentazione adeguata, tra cui congelatori in grado di raggiungere temperature di -20°C/-80°C, dispositivi di controllo grafico della temperatura, sistemi di allarme acustico (data loggers), controlli di qualità del materiale biologico conservato (Ungerer et al., 2020).

**In evidenza:** 1) avere a disposizione almeno 2 ml di plasma; 2) utilizzare kit dedicati per l'estrazione di cfDNA; 3) ottenere un eluato di 20-150 µl; 4) conservare a -20°C, se necessario, o a -80°C a seconda del campione e dell'intervallo temporale antecedente alla fase analitica.

### 1.4.2 Fase analitica

Le metodiche consigliate per l'analisi del cfDNA includono, PCR quantitative (qPCR), PCR digitali (dPCR) e *Next Generation Sequencing* (NGS). Le differenze principali delle due tecnologie sono ben note e riportate nella tabella sottostante (Capasso et al., 2025). Sono state, inoltre, sviluppate RT-PCR ad elevata sensibilità che possono surrogare l'utilizzo delle



tecnologie digitali in alcuni setting analitici.


**Tabella 1.** Differenze tra dPCR ed NGS

<b>Aspetti tecnici</b>	<b>dPCR</b>	<b>NGS</b>
Coverage	Solo varianti hot-spot	Tutte le varianti incluse nelle regioni analizzate
Rilevazione di varianti a singolo nucleotide (SNV)	Si	Si
Rilevazioni di fusioni geniche	Sub-ottimale	Si
Rilevazioni di amplificazioni geniche (CNV)	Sub-ottimale	Si
Limite di rilevazione (LOD)	0.001%-1%	0.01%-5%
Valutazione della <i>tumor fraction</i>	No	Si (solo grandi pannelli di geni)
Turnaround time (TAT)	Poche ore	~ 7 giorni
Costi	<200 euro	>800-1200 euro

Le tecnologie utilizzate per l'analisi del ctDNA devono essere in grado di rilevare in modo affidabile mutazioni clinicamente significative nel cfDNA anche a bassa VAF, es. <0.5%. Il rilevamento di VAF <1% richiede metodi altamente sensibili e specifici per evitare di generare risultati falsi negativi o falsi positivi. La dPCR può raggiungere elevata sensibilità e specificità ma con processività bassa, mentre le piattaforme di NGS possono raggiungere elevata sensibilità e specificità con una processività maggiore analizzando più campioni per tutti i geni di riferimento (*reference range*) nella stessa seduta analitica. Le piattaforme di NGS sono caratterizzate da un'elevata sensibilità analitica, ma richiedono complesse analisi informatiche e sono più costose delle piattaforme di dPCR nell'interpretazione del dato di sequenza rispetto alle tecnologie di dPCR.

Il limite di rilevazione (*limit of detection* o LoD) è un parametro importante nella scelta della metodologia analitica per la ricerca di alterazioni molecolari clinicamente rilevanti a carico del cfDNA, poiché la maggior parte delle varianti è osservata a bassa frequenza (<5%) sottolineando l'importanza di tecnologie digitali nella rilevazione delle alterazioni a carico del ctDNA.

È necessaria cautela quando si imposta una soglia rigida basata su una VAF minima, poiché ciò potrebbe comportare la perdita di risultati veri positivi clinicamente rilevanti, soprattutto in campioni di scarsa qualità. Il LoD può variare notevolmente tra le tecniche e i test molecolari. La dPCR e la NGS hanno mostrato il LoD più basso tra le tecniche molecolari (Lockwood et al., 2023).



**In evidenza:** a parità di tecnologia, non tutte le varianti mostrano lo stesso LOD [ad esempio, in dPCR saggi a singola variante hanno una sensibilità maggiore di saggi multiplex nel ricercare specifiche varianti; in NGS le varianti a singolo nucleotide (SNV) vengono rilevate con maggior efficienza]

#### 1.4.2.1 dPCR

La dPCR rappresenta un avanzamento tecnologico della classica PCR. Il termine *digital* fa riferimento alla modalità di rilevazione di tipo binario, presenza o assenza, del segnale di amplificazione al termine dell'amplificazione stessa all'interno di molteplici camere di reazione o bio-reattori: quello che avviene è la distribuzione di singole molecole di DNA all'interno dei bio-reattori secondo il principio statistico della distribuzione di Poisson. Questa compartimentalizzazione della reazione di amplificazione permette di identificare e quantificare in maniera assoluta anche piccolissime quantità di allele mutato in un *background* di alleli *wild-type*, caratteristica che risulta fondamentale quando si considera la ricerca di mutazioni nel ctDNA, poco rappresentato rispetto al carico di DNA germinale *wild-type* presente in circolo. Questo consente di valutare con elevata precisione e riproducibilità campioni con una VAF inferiore al 1.0%. Tramite appositi software, i risultati possono essere elaborati per fornire la concentrazione della mutazione in termini di copie/ $\mu$ l, copie/ml, frazione allelica, rapporto tra gli alleli e *fractional abundance* (Diehl *et al.*, 2006; Vogelstein & Kinzler, 1999; Zhang *et al.*, 2015).

Le piattaforme di dPCR, a differenza della classica RT-PCR o del sequenziamento genico di nuova generazione (NGS), non analizzano autonomamente i risultati, ma è necessario che l'operatore definisca la soglia di positività in ogni reazione.

Per questo motivo, è molto importante non solo che il laboratorio esibisca un'adeguata esperienza nella gestione di queste metodologie, ma anche che l'interpretazione dei risultati (soprattutto quelli *borderline*) avvenga alla luce di parametri pre-analitici, analitici e clinici. I limiti principali della dPCR sono: a) analisi limitata a mutazioni note con richiesta di sonde specifiche per ogni variante; b) non adatta a screening esplorativi o scoperta di nuove mutazioni; c) bassa capacità di multiplexing; d) poco efficiente per pannelli multi-gene complessi; e) non adatta per l'analisi del Copy Number Variations (CNV) e per fusioni geniche complesse

I risultati di dubbia interpretazione possono riguardare la presenza di un segnale di qualità non ottimale, oppure l'assenza di una mutazione in presenza di progressione di malattia.

### 1.4.2.2 NGS

Le piattaforme di NGS consentono l'analisi simultanea di molteplici target genomici nella stessa seduta analitica. Sulla base di questa considerazione, l'analisi mediante piattaforme di NGS si articola sia nell'analisi di specifiche regioni di DNA (analisi target) che di regioni estese del genoma (analisi dell'intero genoma o dell'esoma) utilizzando pannelli genici per il rilevamento specifico e altamente sensibile delle mutazioni su ctDNA. Sono attualmente disponibili molti pannelli genici dedicati all'analisi del ctDNA in grado di raggiungere sensibilità fino al 98% e specificità fino al 100% in specifici contesti clinici. Alcuni si limitano ad analizzare poche decine di geni, altri arrivano anche a identificare varianti in oltre 500 geni. Quasi tutti i pannelli analizzano solo cfDNA, ma esistono anche pannelli che prevedono l'analisi sia del DNA che dell'RNA circolante. In particolare, l'RNA viene preferito al DNA per il sequenziamento delle fusioni geniche e di altre alterazioni difficili da individuare a livello di DNA. Inoltre, pannelli di *Comprehensive genome profile* (CGPs) sono in grado di valutare aspetti genomici complessi (*tumor mutational burden*, *homologous recombination deficiency*, instabilità microsatellitare) esplorando nuove frontiere nella gestione molecolare dei pazienti oncologici.

L'analisi effettuata mediante NGS può inoltre identificare sia nuove alterazioni molecolari non rilevabili con tecnologie non basate su sequenziamento come la dPCR, sia alterazioni molecolari complesse quali le fusioni inter- ed intra-geniche. Il limite dei pannelli target nell'analisi di mutazioni a partire da campioni di biopsia liquida è imputabile alla ridotta sensibilità di tali strategie nell'individuare mutazioni a bassa frequenza (<1%). L'upgrading dei dispositivi analitici (pannelli) basati su identificatori molecolari univoci o su codici a barre univoci può aiutare ad aumentare la sensibilità e ridurre i falsi negativi, raggiungendo livelli di LoD compresi tra lo 0.1% e lo 0.01%. Per quanto ad elevata sensibilità, si deve sempre ricordare che differenti tipologie di alterazioni hanno differenti livelli di LoD anche all'interno dello stesso pannello (ad es., SNV vs inserzioni/delezioni vs fusioni geniche vs varianti di numero di copie geniche [CNV]).

Uno dei principali problemi associati all'analisi del ctDNA mediante NGS è rappresentato dalla possibilità di falsi positivi dovuti ad artefatti di sequenza, relativamente frequenti per varianti a bassa frequenza allelica. In tal senso, una serie di accorgimenti sono stati adottati nelle nuove tecnologie di sequenziamento per risolvere la problematica degli artefatti. In particolare, l'utilizzo di *barcodes* molecolari, definiti anche *unique molecular identifiers* (UMI), associati a *pipelines* bioinformatiche dedicate, consente in molti casi di ridurre in maniera significativa il tasso di falsi positivi.

## 1.4.3 Fase post-analitica

### 1.4.3.1 Interpretazione del dato

Se si escludono problematiche pre-analitiche, potrebbe essere utile valutare alcuni dei requisiti clinici al fine di interpretare il risultato. Infatti, poiché la qualità e la quantità del DNA ricavato dal plasma sono dipendenti da alcune caratteristiche strettamente legate alla malattia, è necessario tenere in considerazione il carico e le sedi di malattia, le sedi di progressione di malattia, il trattamento in corso, i precedenti e il tempo alla progressione (Ruglioni et al., 2025). Basso carico di malattia, progressioni encefaliche o ossee caratterizzano generalmente il tumore a basso rilascio di ctDNA, che dovrebbe dunque allertare il laboratorista per il rischio di un possibile falso negativo (in assenza di mutazioni) o effettivo positivo (nel caso del risultato borderline) (Ruglioni et al., 2025).

La possibile presenza di mutazioni associate a CHIP aumenta con l'età, presentandosi spesso in geni coinvolti in sindromi mielodisplastiche e/o processi di leucemogenesi. Tuttavia, sono state descritte mutazioni anche in geni prognostici o predittivi di risposta a terapie antitumorali (i.e. *CHEK2*, *ATM*, *IDH1*, *BRCA*, *TP53*, *RAS*) (Brown et al., 2025).

Per distinguere tra mutazioni associate a ctDNA piuttosto che a CHIP, si suggerisce di isolare e conservare la frazione di PBMNC all'atto della separazione del plasma. L'analisi del DNA estratto da PBMNC potrà consentire di stabilire l'origine di un'eventuale variante, qualora il quesito avesse rilevanza clinica (Brown et al., 2025; Chen & Zhao, 2019; Hu et al., 2018).

### 1.4.3.2 Report

#### **Informazioni minime per la richiesta**

Per la generazione di un report attendibile sono necessarie delle informazioni minime in accompagnamento al campione biologico per il quale è richiesta l'analisi:

- L'identificazione univoca del paziente comprendente codice fiscale
- L'identificazione del medico e della struttura che ha richiesto l'analisi
- La motivazione della richiesta (obiettivo dell'esame richiesto)
- Patologia
- Stadio della malattia
- Estensione (carico e siti)
- Trattamenti pregressi
- Altre patologie concomitanti (neoplastiche e non).

### Informazioni minime contenute nel referto

Un referto di biopsia liquida deve contenere le seguenti informazioni minime:


- L'identificazione univoca del paziente comprendente codice fiscale
- L'identificazione del medico e della struttura che ha richiesto l'analisi
- Il materiale utilizzato per l'analisi (tipologia, volume)
- La data del prelievo del materiale utilizzato per l'analisi
- Le modalità di conservazione del prelievo
- La data di arrivo del campione nel laboratorio che esegue l'analisi
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi con indicazione della sensibilità e dei limiti del test
- Le mutazioni indagate
- I risultati del test, con specifiche del tipo di mutazione eventualmente rilevata, VAF e (opzionale) *tumor fraction*
- Sequenza di riferimento, nel caso si utilizzi le piattaforme di NGS
- L'interpretazione del dato e una valutazione complessiva dell'analisi con le eventuali problematiche legate al caso (eventuale commento su CHIP/germinale)
- Tutte le mutazioni rilevabili con la metodica utilizzata vanno dettagliate e insieme al riscontro di eventuali mutazioni nel campione analizzato vanno definite le loro caratteristiche
- Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito (checklist collegata al gestionale LIS del laboratorio), datato e firmato (possibilmente in modo digitale) dal dirigente esecutore e responsabile dell'analisi.

## 2. Applicazione cliniche della biopsia liquida

### 2.1 Tumori gastrointestinali

#### 2.1.1 Tumori del colon-retto

Le applicazioni della biopsia liquida per rilevazione di ctDNA nel carcinoma del colon-retto (CRC) riguardano prevalentemente il setting metastatico per la valutazione della presenza o dell'insorgenza di varianti predittive di risposta o resistenza a terapie farmacologiche, qualora il tessuto non sia disponibile al momento della diagnosi oppure per la valutazione del trattamento con anti-EGFR a progressione di malattia (Pascual *et al.*, 2022).



Nel tumore del colon-retto l'analisi del ctDNA può essere utilizzata per (Tabella 2) (Algoritmo 1):

- tipizzazione dei geni *RAS*, *BRAF*, *HER2*, *MSI*, *NTRK1/2/3* per vicariare la diagnosi su tessuto quando non fattibile (Nakamura *et al.*, 2021; Pascual *et al.*, 2022; Siravegna *et al.*, 2019; Van Cutsem *et al.*, 2016);
- tipizzazione di *RAS* per ri-trattamento con anti-EGFR (Van Cutsem *et al.*, 2016; Normanno *et al.* 2018; Sartore-Bianchi *et al.*, 2022; Ciraci *et al.*, Ann Oncol 2025 e Ciardiello *et al.*, Ann Oncol 2025);

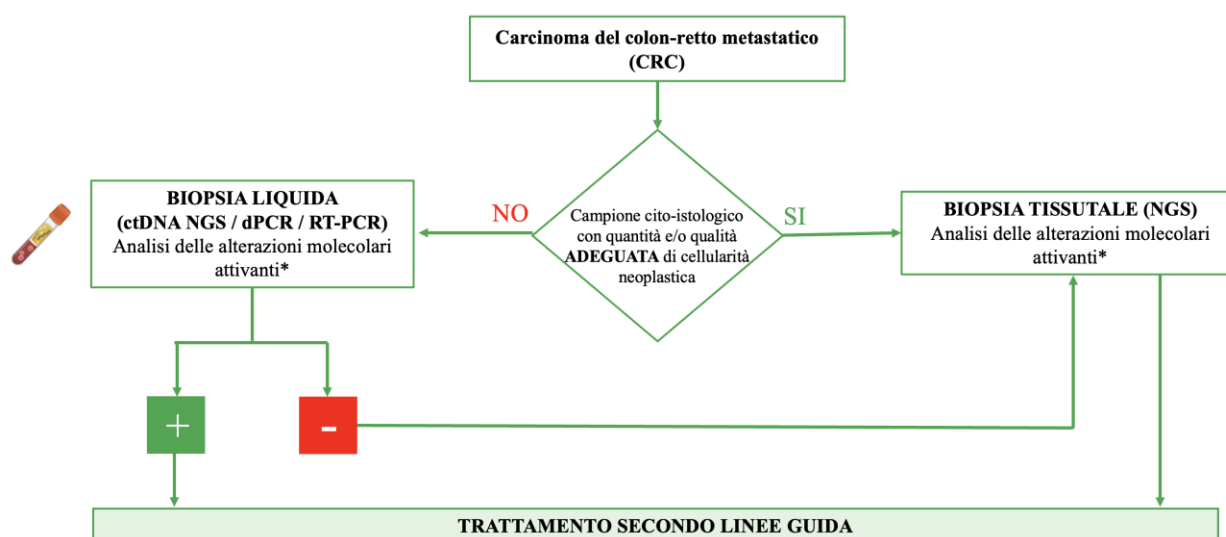
- Numerosi studi hanno già dimostrato la fattibilità di esecuzione dei test molecolari su ctDNA come potenziale sostituto dell'analisi su tessuto tumorale nel CRC metastatico. La concordanza tra i due approcci con le attuali tecnologie è superiore all'80% (Normanno *et al.*, 2018; Procaccio *et al.*, 2021), anche se bisogna considerare che il campione tissutale e il sangue periferico sono campioni biologici con caratteristiche differenti e pertanto non è ragionevole attendersi una concordanza perfetta e che le discrepanze osservate in termini di specificità – assumendo il tessuto tumorale come riferimento – trovano giustificazione nel fatto che la biopsia liquida è in grado di superare l'eterogeneità spaziale e temporale che limitano l'analisi tissutale (Ciardiello *et al.*, 2025; Reinert *et al.*, 2019; Tie *et al.*, 2016). Accanto alle piattaforme NGS, che consentono un'analisi estesa di più geni e alterazioni in un singolo test, la ricerca di mutazioni *actionable* nel CRC può essere eseguita anche mediante RT-PCR e dPCR. Queste metodiche si caratterizzano per rapidità, costi contenuti ed elevata sensibilità, consentendo il rilevamento e la quantificazione assoluta di mutazioni anche a bassa frequenza. L'impiego di RT-PCR e dPCR favorisce un maggiore accesso ai test molecolari e ne rende la profilazione più sostenibile e diffusa, risultando particolarmente rilevante per la selezione della terapia mirata più appropriata (Chen *et al.* 2025).

Complessivamente, poiché il tumore del colon-retto si caratterizza come una malattia ben vascolarizzata e generalmente ad alto carico, il rischio di falsi negativi – soprattutto nel setting metastatico – è molto basso. È opportuno ricordare che alcune localizzazioni metastatiche come il peritoneo e il polmone (in assenza di coinvolgimento epatico) possono presentare maggiori probabilità di risultati falsi negativi.

#### *2.1.1.2 Raccomandazioni emergenti*

La possibilità di utilizzare il ctDNA quale marker di malattia minima residua (MRD) nella malattia in stadio I-III, mediante la ricerca di mutazioni specifiche somatiche presenti nel

tessuto o attraverso approcci agnostici come la valutazione dei marcatori di metilazione e frammentazione, è diventato un settore emergente della ricerca clinica per il CRC localizzato. In questo ambito è stata già osservata una correlazione tra la presenza di ctDNA dopo rimozione chirurgica del tumore primario e la recidiva della malattia, sia in stadio II che III, ed è emerso come, nel caso di analisi di mutazioni somatiche, la ricerca di più di una variante e l'utilizzo di prelievi seriati aumentino l'accuratezza nel predire la presenza di MRD (Tarazona *et al.*, 2019; Tie *et al.*, 2022).



**Algoritmo 1.** Carcinoma del colon-retto metastatico.

\* RAS / BRAFV600E / HER2 / MSI / NTRK1-2-3

### 2.1.2 Carcinoma delle vie biliari

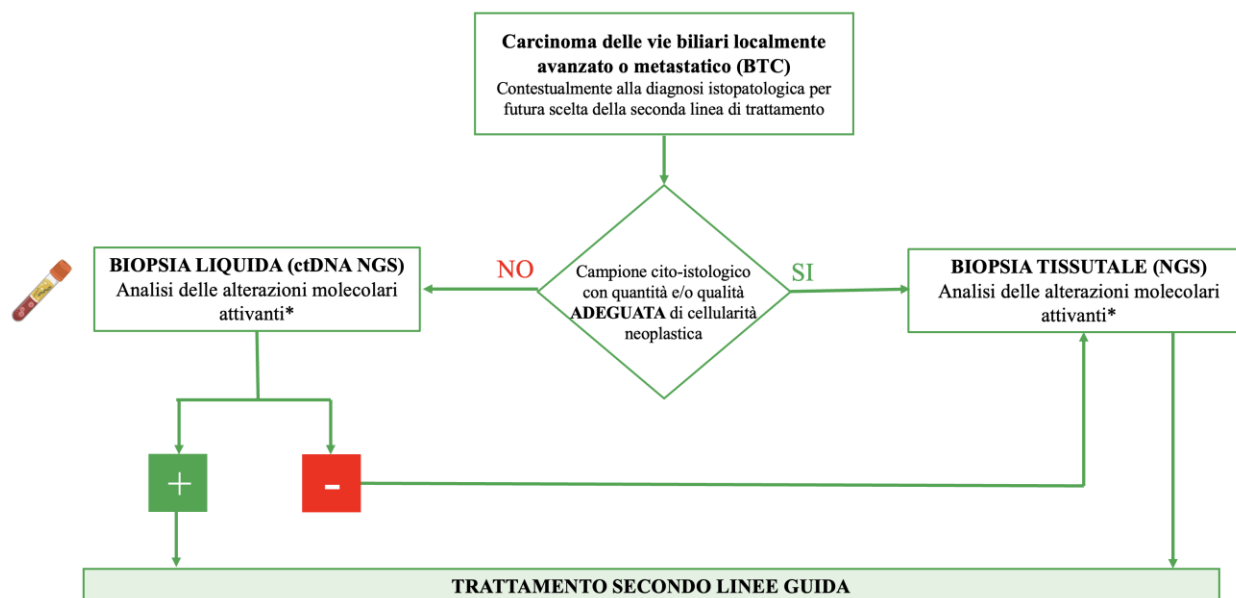
Le applicazioni della biopsia liquida per rilevazione di ctDNA nei tumori delle vie biliari riguardano prevalentemente il setting metastatico per la valutazione della presenza di varianti predittive di risposta a terapie con agenti target, qualora il tessuto non sia disponibile al momento della diagnosi per candidare i pazienti a terapia standard:

**In evidenza:** Nei tumori delle vie biliari l'analisi del ctDNA può essere utilizzata per (Tabella 2) (Algoritmo 2):

- tipizzazione mediante ctDNA con pannello che includa alterazioni genomiche a carico di *FGFR2*, *IDH1/2*, *HER2*, *MSI* e *BRAF* per vicariare la diagnosi su tessuto quando non fattibile, come da linee guida ESMO (Vogel *et al.*, 2023).



I tumori delle vie biliari, caratterizzati da basso carico di malattia, potrebbero essere soggetti a falsi negativi. Si consiglia, pertanto, di valutare attentamente la fattibilità di una biopsia tissutale se l'analisi su ctDNA fosse negativa.




**Algoritmo 2.** Carcinoma delle vie biliari localmente avanzato o metastatico (BTC).

\**FGFR2 / IDH1 / NTRK1-2-3 / HER2 / MSI / BRAFV600E*

## 2.2 Tumore della mammella

Le applicazioni della biopsia nel carcinoma della mammella riguardano prevalentemente il setting metastatico al fine di rilevare alterazioni molecolari *actionable* nei geni *ESR1*, *PIK3CA*, *AKT1* e *PTEN*. Le mutazioni a carico di *PIK3CA* sono driver della lesione e risultano identificabili in qualsiasi momento della storia clinica in fase metastatica. Le mutazioni a carico del gene *ESR1*, invece, sono subclonali, ovvero presenti solo in una frazione delle cellule tumorali e riflettono l'eterogeneità spaziale e temporale del tumore emergendo sotto la pressione selettiva delle terapie sistemiche, come i CDK4/6-inibitori e, in particolare, la terapia endocrina. In questo contesto, la biopsia tissutale per la valutazione delle alterazioni attivanti *ESR1* o per genotipizzare le mutazioni a carico di *PIK3CA* – soprattutto se eseguita su campioni d'archivio o prelevati da un singolo sito metastatico può risultare inadeguata nel rilevare tali mutazioni, non rappresentando l'intero panorama molecolare aggiornato della malattia. Sulla base dell'evidenza prodotta dagli studi registrativi EMERALD, SOLAR-1 e CAPItello-291,



raccomandazioni e linee guida internazionali e nazionali, tra cui AIOM, ESMO ed ASCO, raccomandano di eseguire la ricerca delle mutazioni attivanti *ESR1* preferenzialmente su ctDNA, e del pathway di PIK3CA/AKT/PTEN su biopsia liquida quando il tessuto non è informativo in termini di profilazione genomica o dopo progressione al trattamento con CDK4/6-inibitori + terapia endocrina per la scelta della linea successiva (Bidard, Hardy-Bessard *et al.*, 2022; Schagerholm *et al.*, 2024, Turner *et al.*, 2023). Va sottolineato che alterazioni molecolari (sbilanciamento del numero di copie, ampie delezioni) che inducono il fenotipo molecolare “PTEN loss” sono difficilmente identificabili in biopsia liquida sottolineando la necessità di integrazione con il tessuto corrispondente, quando disponibile.


**In evidenza:** Nel tumore della mammella metastatico ER+/HER2-negativo l’analisi del ctDNA può essere utilizzata nelle pazienti in progressione ad una linea con inibitori di CDK4/6 + terapia endocrina per l’identificazione di (Tabella 2) (Algoritmo 3):

- Mutazioni del gene codificante il recettore alfa per gli estrogeni (*ESR1*) al fine di identificare pazienti candidabili a trattamento con farmaci degradatori selettivi del recettore estrogenico (SERDs) (Bidard *et al.*, 2022).
- Alterazioni genomiche nel pathway PI3K/AKT/PTEN, al fine di identificare pazienti candidabili a trattamento con capivasertib o alpelisib, secondo indicazione clinica (Chaki *et al.*, 2025; Schagerholm *et al.*, 2024).

Complessivamente, poiché il tumore della mammella si caratterizza come una malattia ben vascolarizzata e generalmente ad alto carico, il rischio di falsi negativi – soprattutto nel setting metastatico – è molto basso. È opportuno ricordare che alcune localizzazioni metastatiche come il tessuto osseo (malattia a pattern metastatico osseo prevalente in assenza di coinvolgimento epatico) possano presentare maggiori probabilità di risultati falsi negativi.

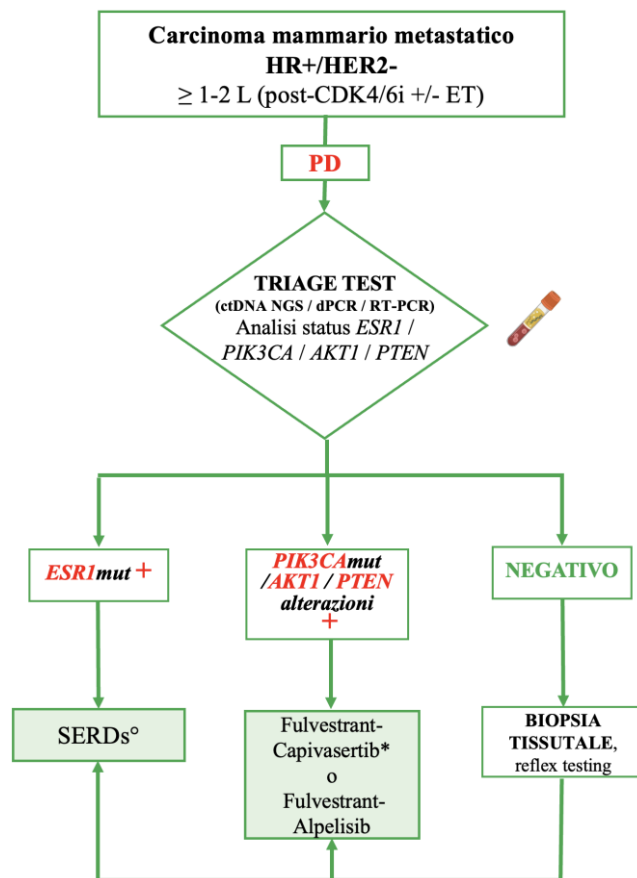
### 2.2.1 Raccomandazioni emergenti

La possibilità di utilizzare il ctDNA quale marker precoce di resistenza al trattamento è stato valutato negli studi di fase 3 PADA-1 (switch a Fulvestrant) e Serena-6 (switch al serd orale camizestran) (Bidard *et al.*, 2025). In pazienti sottoposti a terapia di prima linea con un inibitore dell’aromatasi più un inibitore di CDK4/6 per il carcinoma mammario avanzato, le mutazioni di *ESR1* risultano rilevabili nel ctDNA con una mediana di circa 6 mesi prima della progressione della malattia (Bidard, Hardy-Bessard, *et al.*, 2022). Il rilevamento delle mutazioni di *ESR1* prima della progressione della malattia può consentire un trattamento



target alternativo per ritardare la progressione clinica e prolungare la durata del beneficio della terapia di prima linea. I risultati dello studio Serena-6 (Bidard 2025) hanno dimostrato che il monitoraggio periodico per la rilevazione delle mutazioni di *ESR1* su ctDNA nei pazienti con carcinoma mammario avanzato ER+/HER2-negativo durante il trattamento con un inibitore dell'aromatasi+inibitore di CDK4/6, può permettere uno switch precoce (prima della progressione radiologica) a camizestrant (SERD orale) e continuazione di un inibitore di CDK4/6, con una sopravvivenza libera da progressione significativamente più lunga rispetto ai pazienti che hanno mantenuto la combinazione inibitore CDK4/6+antiaromatasi fino a progressione radiologica.

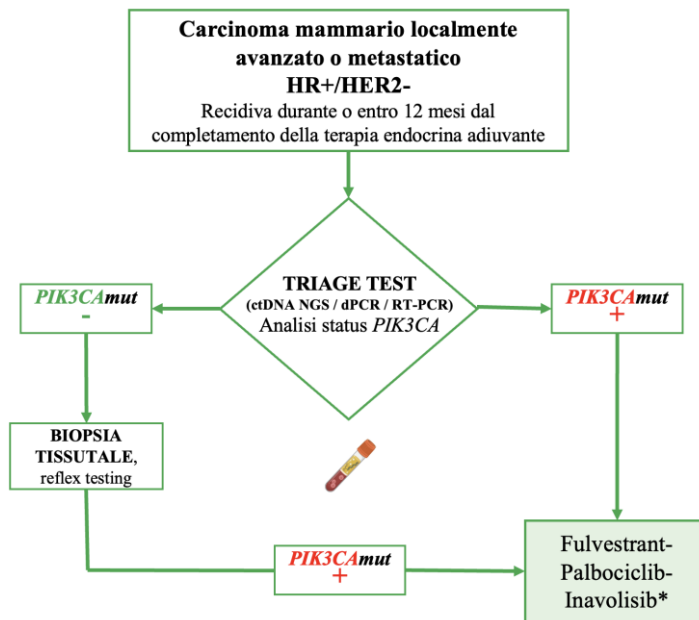
Recentemente, lo studio INAVO120 ha portato a un cambiamento significativo dello scenario terapeutico in prima linea, dimostrando che la combinazione di inavolisib + palbociclib + fulvestrant migliora significativamente sia la PFS che la OS, posticipando l'inizio della chemioterapia di quasi due anni. Tali risultati hanno condotto alla recente approvazione EMA di questo regime e all'inserimento nelle linee guida internazionali come nuova opzione standard in prima linea per pazienti HR+/HER2- con mutazione *PIK3CA* dopo recidiva in corso di oppure entro 12 mesi dal completamento della terapia endocrina adiuvante (Komal L. Jhaveri et al. 2025). Si rimane in attesa della sua approvazione AIFA per l'ingresso in pratica clinica in Italia (Algoritmo 4).



**Algoritmo 3.** Management del carcinoma mammario metastatico HR+/HER2- alla progressione di malattia dopo terapia di prima linea

\* Indicazione emergente (Approvato EMA), in corso di approvazione AIFA

° Elacestrant (AIFA approvato) o Camizestrant (in corso di approvazione AIFA)



**Algoritmo 4.** Management del carcinoma mammario localmente avanzato o metastatico HR+/HER2- in terapia di prima linea

\* Indicazione emergente (Approvato EMA), in corso di approvazione AIFA


## 2.3 Tumori polmonari

Le applicazioni della biopsia liquida per rilevazione di ctDNA nei tumori polmonari riguardano prevalentemente il setting avanzato del tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC), a istologia non-squamosa e nei casi a istologia squamosa caratterizzati da particolari caratteristiche cliniche (ad esempio, pazienti giovani e non/lieve fumatori), per la valutazione della presenza di varianti predittive di risposta a terapie farmacologiche, qualora il tessuto non sia disponibile al momento della diagnosi per candidare i pazienti a terapia standard:

Nel NSCLC l'analisi del ctDNA può essere utilizzata per (Tabella 2):

- tipizzazione mediante ctDNA con pannello che includa regioni target di *ALK*, *EGFR*, *MET*, *BRAF*, *HER2*, *KRAS p.G12C*, *NTRK1/2/3*, *RET*, *ROS1* per vicariare la diagnosi su tessuto quando non fattibile, come da raccomandazioni ESMO (Pascual et al., 2022).


In accordo con le ultime raccomandazioni nazionali ed internazionali, nell'impossibilità di



eseguire una biopsia tissutale o in caso di inadeguata o incompleta profilazione molecolare, la valutazione delle alterazioni molecolari su ctDNA può rappresentare una valida alternativa per la definizione della strategia terapeutica di prima linea nei pazienti affetti da NSCLC avanzato (Algoritmo 5). L'attuale principale impiego della biopsia liquida è, dunque, nel NSCLC avanzato non pre-trattato, un setting dove fino al 20-40% dei casi la quantità e/o qualità del tessuto disponibile possono non essere adeguate alla caratterizzazione molecolare prevista, anche a fronte di una diagnosi morfologica completa (Malapelle *et al.* 2021).

L'analisi del ctDNA rappresenta un'opzione praticabile già in fase di malattia naïve al trattamento ed è particolarmente indicata in condizioni cliniche specifiche: quando si preveda un ritardo significativo nell'ottenimento del tessuto tumorale, qualora le procedure invasive risultino ad elevatissimo rischio o controindicate, o nei casi in cui l'unico sito accessibile alla biopsia sia rappresentato dall'osso. È opportuno, tuttavia, condurre tali procedure in centri ad elevata specializzazione, come sottolineato anche dalle ultime indicazioni dell'International Association for the Study of Lung Cancer (Rolfo *et al.*, 2021). Per la valutazione dei biomarcatori molecolari approvati nella pratica clinica in pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato, data la disponibilità di materiale frequentemente limitato e inadeguato dal punto di vista qualitativo, rispetto alle tecnologie single-gene convenzionali è consigliabile l'impiego del NGS che potrebbe consentire l'analisi simultanea di multipli biomarcatori. L'impiego di tale tecnologia risulta indicato anche in considerazione del numero crescente di biomarcatori molecolari predittivi emergenti per i quali vi sono terapie target efficaci disponibili nel contesto di programmi di uso compassionevole/accesso allargato e/o trial clinico in Italia (<https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2024-neoplasie-del-polmone/>). In tali scenari, il ctDNA può essere considerato un approccio alternativo o, in talune circostanze, complementare all'analisi NGS su tessuto per la valutazione dei biomarcatori predittivi di risposta terapeutica.

È tuttavia fondamentale riconoscere i limiti intrinseci di questa tecnologia. Il tumore del polmone si caratterizza per un potenziale di *shedding* del ctDNA variabile (derivante da indice di proliferazione e grado di differenziazione delle cellule tumorali, necrosi, carico e sedi di malattia) (Ruglioni *et al.*, 2025; Driussi *et al.*, 2025), per questo motivo il rischio di ottenere falsi negativi è considerevole e si suggerisce di valutare la fattibilità di una biopsia tissutale se l'analisi su ctDNA fosse negativa. Ad esempio, tumori di piccole dimensioni, prevalentemente intratoracici o con localizzazione intracranica isolata, sono frequentemente associati a un'elevata probabilità di risultati falsi negativi. L'analisi in biopsia liquida può essere estesa anche allo studio di fusioni/traslocazioni previa opportuna scelta di una metodica validata e a seconda dello scenario clinico di malattia. Tuttavia, i test su ctDNA mostrano una sensibilità ridotta nell'identificazione di riarrangiamenti genici (fusioni). L'analisi RNA su tessuto rimane



superiore nell'individuazione di varianti di splicing (mutazioni skipping dell'esone 14 di *MET*) e fusioni di geni driver (*ALK*, *RET*, *ROS1*, *NTRK1/2/3*) (Benayed et al. 2021). Pertanto, laddove disponibile e di adeguata qualità, il test molecolare su tessuto continua a rappresentare lo standard di riferimento rispetto al ctDNA, pur potendo anch'esso essere limitato da scarsa cellularità o qualità del campione.

Nei pazienti già sottoposti a trattamenti sistemici, l'esperienza clinica con la mutazione di resistenza EGFR p.T790M ha introdotto un modello operativo di utilizzo del ctDNA: l'analisi plasmatica costituisce il primo step per l'identificazione della mutazione, con ricorso alla biopsia tissutale qualora il risultato sia negativo, riducendo così la necessità di procedure invasive (Passiglia et al., 2018). In questo contesto, nonostante il crescente utilizzo di osimertinib nella I linea standard di pazienti affetti da mutazioni attivanti comuni di EGFR, un'ulteriore applicazione dell'analisi del ctDNA riguarda l'identificazione della presenza di mutazione EGFR p.T790M nei pazienti affetti da mutazioni attivanti non comuni di EGFR in progressione sistemica da inibitori di EGFR di II generazione (Algoritmo 6).

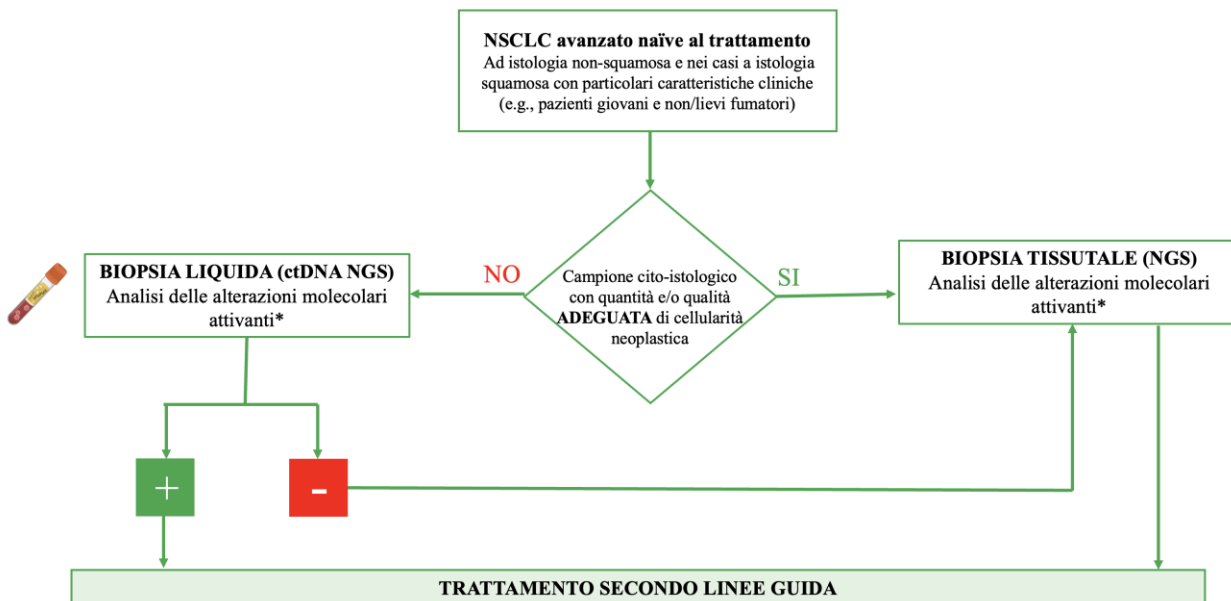
Va tuttavia sottolineato che modificazioni istologiche di resistenza, quali la trasformazione neuroendocrina o la differenziazione squamosa, non sono attualmente rilevabili tramite ctDNA e richiedono una valutazione diretta del tessuto qualora vi sia sospetto clinico.

### 2.3.1 Raccomandazioni emergenti

Per i pazienti affetti da NSCLC avanzato oncogene-addicted in progressione sistemica a una I linea standard, la biopsia liquida rappresenta un approccio iniziale accettabile e clinicamente appropriato per l'identificazione dei meccanismi di resistenza alle terapie a bersaglio molecolare nei pazienti. La possibilità di analizzare ampie regioni genomiche mediante NGS ha difatti ampliato notevolmente l'utilizzo della biopsia liquida per lo studio dei meccanismi di resistenza ai farmaci a bersaglio molecolare.

In tal senso, grazie all'analisi in NGS della biopsia liquida sono stati scoperti molti dei meccanismi di resistenza agli inibitori tirosin-chinasici di nuova generazione nel NSCLC. Questi approcci devono essere in qualche modo considerati sperimentali, in quanto non sono disponibili al momento terapie specifiche per queste alterazioni nella pratica clinica. È innegabile, tuttavia, che l'acquisizione di queste informazioni può favorire la personalizzazione dei trattamenti e l'eventuale arruolamento in studi clinici. Pertanto, seppur non indicato nella pratica clinica, l'impiego del test NGS su biopsia liquida per lo studio della resistenza in pazienti trattati con farmaci a bersaglio molecolare può sicuramente fornire informazioni rilevanti in centri accademici che abbiano a disposizione un ampio numero di *trials* clinici. Vista la complessità dei dati che derivano da ampi pannelli genici e la necessità di una loro

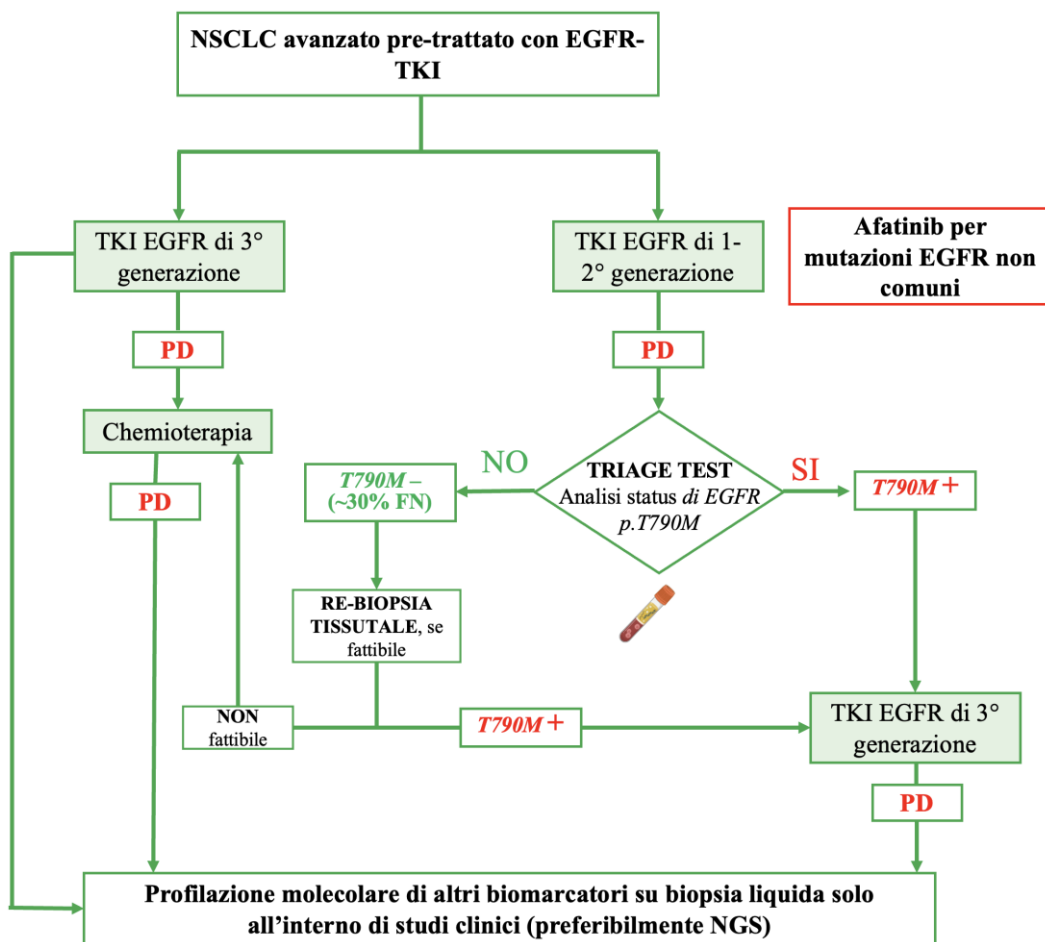
corretta interpretazione nel contesto dello scenario clinico, si raccomanda che i risultati di test NGS effettuati con pannelli ampi siano discussi nell'ambito dei *Molecular Tumor Boards* (MTBs).



**Algoritmo 5.** NSCLC avanzato naïve al trattamento.

\* EGFR / ALK / MET / BRAF / HER2 / KRAS p.G12C / NTRK1-2-3 / RET / ROS1






**Algoritmo 6.** NSCLC avanzato pre-trattato con EGFR-TKI.

## 2.4 Tumori genito-urinari

### 2.4.1 Tumore della prostata

Alterazioni genetiche a carico del sistema di ricombinazione omologa (Homologous Recombination Repair, HRR) sono descritte in circa il 20-25% dei pazienti con carcinoma prostatico metastatico (mCP) resistente alla castrazione (mCPRC). Nell'ambito dei geni HRR, le varianti patogenetiche e verosimilmente patogenetiche (VP) a carico del gene *BRCA2* sono le più frequenti (7 -13% nel setting mCPRC). Differenze sono riportate nei diversi stadi di malattia (più frequenti nella malattia metastatica rispetto a quella localizzata) e in relazione alla natura germinale o somatica dell'alterazione (Robinson et al., 2015; Pritchard et al., 2016). Recenti



evidenze stimano una prevalenza delle VP *BRCA1/2* germinali nella popolazione italiana del 4.3% in pazienti con mCP, rispetto al 9.5% di VP *BRCA1/2* di natura somatica (Incorvaia et al., 2025). Il riscontro di VP a carico dei geni *BRCA1/2* è associato a caratteristiche prognostiche e outcomes clinici più sfavorevoli (Castro et al., 2013; Mateo J et al., 2017), e rappresenta un biomarcatore predittivo di sensibilità al trattamento con inibitori dell'enzima Poli (ADP-ribosio) Polimerasi (PARPi).


Ai fini della selezione del trattamento con PARPi, il tessuto tumorale rappresenta il gold standard per l'identificazione delle VP dei geni *BRCA1/2*. Il test può essere eseguito in pazienti con CP metastatico, indipendentemente dallo stato di sensibilità/resistenza alla castrazione. Il riscontro di una VP a carico dei geni *BRCA1/2* su campione di tessuto tumorale richiede lo studio della variante su campione di sangue periferico per stabilirne l'origine somatica o germinale. Per le indicazioni all'esecuzione del test germinale con finalità preventiva nel CP si rimanda alle specifiche raccomandazioni intersocietarie AIOM ([https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2023/04/2023-03\\_Racc\\_BRCA\\_Prostata.pdf](https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2023/04/2023-03_Racc_BRCA_Prostata.pdf)).

E' bene precisare che la probabilità di successo del test *BRCA1/2* su tessuto tumorale è fortemente influenzata da numerose variabili, principalmente dal tipo di tessuto utilizzato per l'analisi (biopsia vs prostatectomia vs metastasi, prevalentemente ossee), dal tempo di conservazione e di archiviazione del preparato, dalle condizioni di conservazione del campione e dal contenuto tumorale. I principali trials clinici hanno dimostrato che il test somatico su campioni tissutali fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) fornisce risultati informativi nel 60-70% dei casi a causa della bassa cellularità del tumore e dell'elevato grado di frammentazione del DNA (Hussain et al. 2022).

Relativamente all'utilizzo della biopsia liquida nel CP, due importanti studi hanno mostrato una concordanza superiore all'80% del test tra tessuto tumorale e ctDNA nell'identificazione di alterazioni *BRCA1/2* (Chi et al., 2023; Tukachinsky et al., 2021).

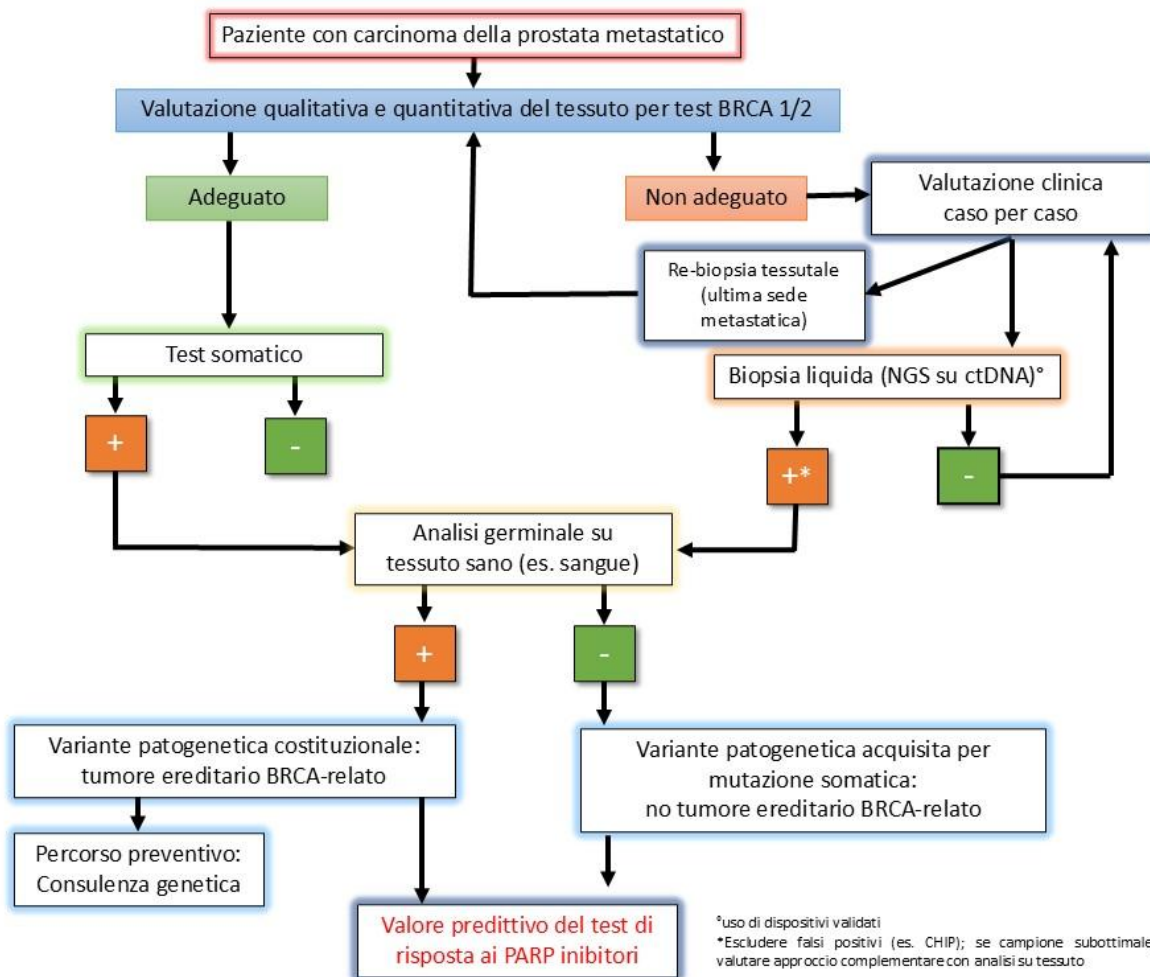
**In evidenza:** nel tumore della prostata l'analisi del ctDNA può essere utilizzata per (Tabella 2) (Algoritmo 7):

- la valutazione di varianti a carico dei geni *BRCA1/2* in pazienti metastatici per i quali il tessuto d'archivio non sia disponibile o sia non adeguato per quantità o qualità, all'esecuzione della analisi molecolare, e non sia possibile ottenere una nuova biopsia tissutale.



Per quanto riguarda l'attendibilità dei risultati in biopsia liquida nel tumore della prostata, vanno considerati alcuni importanti fattori biologici e tecnologici:

- 1) il test in biopsia liquida per il riscontro delle alterazioni di interesse clinico a carico dei geni *BRCA1/2* richiede tecnologie ad elevata sensibilità, in grado di rilevare alterazioni con frequenza <1.0%, e laboratori certificati con adeguata esperienza
- 2) lo *shedding* del ctDNA è molto variabile tra i pazienti con tumore della prostata metastatico, con valori di tumor fraction più elevata nei pazienti con mCRPC pluritrattati rispetto a quelli naive al trattamento (Annala et al., 2018), e in pazienti con più elevato burden tumorale (Fonseca et al., 2024)
- 3) la localizzazione della malattia metastatica (soprattutto quando ossea o linfonodale, sedi prevalenti, rispetto a quella epatica) impatta notevolmente sul basso rilascio del ctDNA (Fonseca et al., 2024)
- 4) alcune alterazioni, come le delezioni omozigoti e gli ampi riarrangiamenti (frequenti nel tumore della prostata *BRCA* mutato) sono difficilmente rilevabili su ctDNA (Chi et al., 2023)
- 5) varianti in *BRCA*, *ATM*, *CHECK* potrebbero derivare da fenomeni di ematopoiesi clonale (Jensen et al., 2021).



**Algoritmo 7.** Carcinoma della prostata metastatico.

### 2.4.2 Tumore della vescica

Le applicazioni della biopsia liquida per rilevazione di ctDNA nei tumori della vescica riguardano prevalentemente il setting metastatico, per la valutazione della presenza di varianti predittive di risposta a terapie farmacologiche, qualora il tessuto non sia disponibile al momento della diagnosi per candidare i pazienti a terapia standard.

**In evidenza:** nel tumore della vescica l'analisi del ctDNA può essere utilizzata per (Tabella 2):

- tipizzazione mediante ctDNA con pannello che includa regioni target di *FGFR*, *NTRK1/2/3* per vicariare la diagnosi su tessuto quando non fattibile, come da raccomandazioni ESMO (Pascual et al., 2022).

### 2.4.2.1 Raccomandazioni emergenti

Nel tumore della vescica il ctDNA rilevato prima della terapia neoadiuvante può essere un importante marcatore prognostico e ha dimostrato di essere correlato con la recidiva e la sopravvivenza. Inoltre, la negativizzazione del ctDNA durante la terapia neoadiuvante è stata associata a un down-staging patologico riscontrato al momento dell'intervento chirurgico. Questi dati suggeriscono che nei pazienti con ctDNA positivo, il carico di ctDNA nel tempo può essere utilizzato come surrogato di malattia o di progressione della malattia. Non da ultimo, anche il rilevamento del ctDNA dopo l'intervento chirurgico definitivo, come biomcatore di malattia minima residua (MRD), ha dimostrato di essere un importante marcatore prognostico e predittivo utile ai fini della decisione sulla effettuazione o meno di una terapia adiuvante (Powles et al., 2021, 2025).

**Tabella 2.** Tabella delle varianti ESCAT 1 tumore-specifiche (modificata da Pascual et al., 2022)


Patologia	Gene/biomcatore	Variante/status	ESCAT
Colon-retto	<i>BRAF</i>	p.V600X	IA
	<i>RAS</i>	Exon 2,3,4	NA
	<i>KRAS</i>	p.G12C	IA
	<i>ERBB2/HER2</i>	Amplificazione	IIB
	<i>POLE/POLD1</i>	Mutazioni	IIB
	<i>NTRK1/2/3</i>	Fusioni	IC
	<i>RET</i>	Fusioni	IC
	MS	MSI-H	IA
Vie biliari	<i>IDH1</i>	Mutazioni attivanti	IA
	<i>IDH2</i>	Mutazioni attivanti	IIIA
	<i>FGFR2</i>	Fusioni e riarrangiamenti	IB
	<i>FGFR2</i>	Mutazioni	IIB
	<i>ERBB2/HER2</i>	Amplificazione	IC
	<i>ERBB2/HER2</i>	Mutazioni	IIB
	<i>BRAF</i>	p.V600E	IB
	<i>BRCA1/2</i>	Mutazioni	IIIA
	<i>PALB2</i>	Mutazioni	IIIA
	<i>KRAS</i>	p.G1C	IC
	<i>NTRK 1/2/3</i>	Fusioni	IC
	<i>RET</i>	Fusioni	IC
	MS	MSI-H	IC
	Mammella	<i>PIK3CA</i>	Mutazioni attivanti
<i>ESR1</i>		Mutazioni attivanti	IA



	<i>AKT</i> <i>PTEN</i>	Mutazioni attivanti Perdita di funzione	IA IA
Tumore del polmone	<i>EGFR</i>	Mutazioni comuni e non comuni, inserzioni dell'esone 20, mutazione T790M Fusioni e mutazioni di resistenza	IA IA
	<i>ALK</i>	Mutazioni dello skipping dell'esone 14	IB
	<i>MET</i>	p.G12C	IA
	<i>KRAS</i>	p.V600X	IA
	<i>BRAF</i>	Fusioni e mutazioni attivanti	IA
	<i>RET</i>	Fusioni	IA
	<i>ROS1</i>	Fusioni	IA
	<i>NTRK 1/2/3</i> <i>ERBB2/HER2</i>	Inserzioni dell'esone 20, mutazioni transmembrana, amplificazione	IIA IIB
Tumore della prostata	<i>BRCA1/2</i>	Mutazioni	IA
Tumore della vescica	<i>FGFR</i>	Mutazioni	IB
	<i>FGFR3</i>	Fusioni <i>FGFR3-TACC3</i>	IB
	<i>NTRK 1/2/3</i>	Fusioni	IC

## Bibliografia

- Alidousty, C., Brandes, D., Heydt, C., Wagener, S., Wittersheim, M., Schafer, S. C., Holz, B., Merkelbach-Bruse, S., Buttner, R., Fassunke, J., & Schultheis, A. M. (2017). Comparison of Blood Collection Tubes from Three Different Manufacturers for the Collection of Cell-Free DNA for Liquid Biopsy Mutation Testing. *J Mol Diagn*, 19(5), 801-804.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.06.004>
- Annala, M., Vandekerkhove, G., Khalaf, D., Taavitsainen, S., Beja, K., Warner, E. W., Sunderland, K., Kollmannsberger, C., Eigl, B. J., Finch, D., Oja, C. D., Vergidis, J., Zulfiqar, M., Azad, A. A., Nykter, M., Gleave, M. E., Wyatt, A. W., & Chi, K. N. (2018). Circulating Tumor DNA Genomics Correlate with Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Discov*, 8(4), 444-457. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0937>
- Bidard, F. C., Hardy-Bessard, A. C., Dalenc, F., Bachelot, T., Pierga, J. Y., de la Motte Rouge, T., Sabatier, R., Dubot, C., Frenel, J. S., Ferrero, J. M., Ladoire, S., Levy, C., Mouret-Reynier, M. A., Lortholary, A., Grenier, J., Chakiba, C., Stefani, L., Plaza, J. E., Clatot, F., . . . investigators, P.-. (2022). Switch to fulvestrant and palbociclib versus no switch in advanced breast cancer with rising ESR1 mutation during aromatase inhibitor and palbociclib therapy (PADA-1): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 23(11), 1367-1377.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00555-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00555-1)
- Bidard, F. C., Kaklamani, V. G., Neven, P., Streich, G., Montero, A. J., Forget, F., Mouret-Reynier, M. A., Sohn, J. H., Taylor, D., Harnden, K. K., Khong, H., Kocsis, J., Dalenc, F., Dillon, P. M., Babu, S., Waters, S., Deleu, I., Garcia Saenz, J. A., Bria, E., . . . Bardia, A. (2022). Elacestrant (oral selective



estrogen receptor degrader) Versus Standard Endocrine Therapy for Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III EMERALD Trial. *J Clin Oncol*, 40(28), 3246-3256. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.00338>

Bidard, F. C., Mayer, E. L., Park, Y. H., Janni, W., Ma, C., Cristofanilli, M., Bianchini, G., Kalinsky, K., Iwata, H., Chia, S., Fasching, P. A., Brufsky, A., Nowecki, Z., Pascual, J., Moreau, L., Chen, S. C., Karadurmus, N., Gal-Yam, E. N., Jung, K. H., . . . Group, S.-S. (2025). First-Line Camizestrant for Emerging ESR1-Mutated Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*, 393(6), 569-580. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2502929>

Brown, D. W., Sun, D., Fine, A. D., He, S., McDevitt, M., Pontbriand, K., Polisecki, E., Kou, A., Li, M., Zhang, S., Kuang, Z., Fabrizio, D., Madison, R. W., He, J., Assaf, Z. J., Powles, T., Sweeney, C., Gandara, D., Antonarakis, E. S., . . . Xu, C. (2025). Fragmentomic-based algorithm to computationally predict tumor-somatic, germline, and clonal hematopoiesis variant origin in liquid biopsy. *J Liq Biopsy*, 9, 100311. <https://doi.org/10.1016/j.jlb.2025.100311>

Capasso, I., Nero, C., Anderson, G., Del Re, M., Perrone, E., Fanfani, F., Scambia, G., Cucinella, G., Mariani, A., Choong, G., & Reynolds, E. (2025). Circulating tumor DNA in endometrial cancer: clinical significance and implications. *Int J Gynecol Cancer*, 35(4), 101656. <https://doi.org/10.1016/j.ijgc.2025.101656>

Castro E, Goh C, Olmos D, Saunders E, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M, Mahmud N, Dadaev T, Govindasami K, Guy M, Sawyer E, Wilkinson R, Ardern-Jones A, Ellis S, Frost D, Peock S, Evans DG, Tischkowitz M, Cole T, Davidson R, Eccles D, Brewer C, Douglas F, Porteous ME, Donaldson A, Dorkins H, Izatt L, Cook J, Hodgson S, Kennedy MJ, Side LE, Eason J, Murray A, Antoniou AC, Easton DF, Kote-Jarai Z, Eeles R. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2013 May 10;31(14):1748-57. doi: 10.1200/JCO.2012.43.1882. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23569316; PMCID: PMC3641696.

Chaki, M., Benrashid, M., Puri, S., Sivakumar, S., Sokol, E. S., Briceno, J. M., & Neil, V. (2025). Retrospective comparison between breast cancer tissue- and blood-based next-generation sequencing results in detection of PIK3CA, AKT1, and PTEN alterations. *Breast Cancer Res*, 27(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13058-025-02055-0>

Chen, M., & Zhao, H. (2019). Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics*, 13(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0220-8>

Chi, K. N., Barnicle, A., Sibilla, C., Lai, Z., Corcoran, C., Barrett, J. C., Adelman, C. A., Qiu, P., Easter, A., Dearden, S., Oxnard, G. R., Agarwal, N., Azad, A., de Bono, J., Mateo, J., Olmos, D., Thiery-Vuillemin, A., & Harrington, E. A. (2023). Detection of BRCA1, BRCA2, and ATM Alterations in Matched Tumor Tissue and Circulating Tumor DNA in Patients with Prostate Cancer Screened in PROfound. *Clin Cancer Res*, 29(1), 81-91. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-0931>

Ciardiello, D., Boscolo Bielo, L., Napolitano, S., Latiano, T. P., De Stefano, A., Tamburini, E., Toma, I., Bordonaro, R., Russo, A. E., Pisconti, S., Nisi, C., Lotesoriere, C., Vallarelli, S., Lonardi, S., Iacono, D., Cremolini, C., Tortora, G., Tagliaferri, P., Pietrantonio, F., . . . Martini, G. (2025). Comprehensive genomic profiling by liquid biopsy portrays metastatic colorectal cancer mutational landscape to predict antitumor efficacy of FOLFIRI plus cetuximab in the CAPRI-2 GOIM trial. *ESMO Open*, 10(4), 104511. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2025.104511>

Ciardiello D, Martini G, Boscolo Bielo L, Pietrantonio F, Raimondi A, Manca P, Pisconti S, Nisi C,

- 
- Tortora G, Salvatore L, Sartore-Bianchi A, Siena S, Blasi L, Ongaro E, Zaniboni A, Pinto C, Antonuzzo L, Avallone A, Normanno N, Santabarbara G, Zampino MG, Berardi R, Cogoni A, Lotesoriere C, Latiano TP, Maiello E, Fazio N, Curigliano G, Bordonaro R, Troiani T, De Vita F, Martinelli E, Ciardiello F, Napolitano S; CAVE-2 GOIM study group. Cetuximab rechallenge in molecularly selected metastatic colorectal cancer: the randomized CAVE-2 GOIM trial. *Ann Oncol*. 2025 Dec 22:S0923-7534(25)06334-3. doi: 10.1016/j.annonc.2025.12.014. Epub ahead of print. PMID: 41443411.
- Ciraci P, Germani MM, Pietrantonio F, Manca P, Lonardi S, Busico A, Bergamo F, Burgio V, Mannavola F, Di Donato S, Fenocchio E, Palermo F, Capone I, De Grandis MC, Pella N, Scartozzi M, Antonuzzo L, Passardi A, Claravezza M, Salvatore L, Tamberi S, Randon G, Conca E, Conca V, Antoniotti C, Moretto R, Masi G, Boni L, Rossini D, Cremolini C; GONO Foundation Investigators. Re-treatment with panitumumab followed by regorafenib versus the reverse sequence in chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with RAS and BRAF wild-type circulating tumor DNA: the PARERE study by GONO. *Ann Oncol*. 2026 Jan;37(1):79-91. doi: 10.1016/j.annonc.2025.10.002. Epub 2025 Oct 18. PMID: 41115464.
- Danesi, R., Lo, Y. M. D., Oellerich, M., Beck, J., Galbiati, S., Re, M. D., Lianidou, E., Neumaier, M., & van Schaik, R. H. N. (2021). What do we need to obtain high quality circulating tumor DNA (ctDNA) for routine diagnostic test in oncology? - Considerations on pre-analytical aspects by the IFCC workgroup of ctDNA. *Clin Chim Acta*, 520, 168-171. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.05.033>
- Diehl, F., Li, M., He, Y., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Dressman, D. (2006). BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods*, 3(7), 551-559. <https://doi.org/10.1038/nmeth898>
- Esposito Abate, R., Pasquale, R., Fenizia, F., Rachiglio, A. M., Roma, C., Bergantino, F., Forgiione, L., Lambiase, M., Sacco, A., Piccirillo, M. C., Morabito, A., & Normanno, N. (2019). The role of circulating free DNA in the management of NSCLC. *Expert Rev Anticancer Ther*, 19(1), 19-28. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1548938>
- Fonseca NM, Maurice-Dror C, Herberts C, Tu W, Fan W, Murtha AJ, Kollmannsberger C, Kwan EM, Parekh K, Schönlaue E, Bernales CQ, Donnellan G, Ng SWS, Sumiyoshi T, Vergidis J, Noonan K, Finch DL, Zulfiqar M, Miller S, Parimi S, Lavoie JM, Hardy E, Soleimani M, Nappi L, Eigl BJ, Kollmannsberger C, Taavitsainen S, Nykter M, Tolmeijer SH, Boerrigter E, Mehra N, van Erp NP, De Laere B, Lindberg J, Grönberg H, Khalaf DJ, Annala M, Chi KN, Wyatt AW. Prediction of plasma ctDNA fraction and prognostic implications of liquid biopsy in advanced prostate cancer. *Nat Commun*. 2024 Feb 28;15(1):1828. doi: 10.1038/s41467-024-45475-w. PMID: 38418825; PMCID: PMC10902374.
- Hu, Y., Ulrich, B. C., Supplee, J., Kuang, Y., Lizotte, P. H., Feeney, N. B., Guibert, N. M., Awad, M. M., Wong, K. K., Janne, P. A., Paweletz, C. P., & Oxnard, G. R. (2018). False-Positive Plasma Genotyping Due to Clonal Hematopoiesis. *Clin Cancer Res*, 24(18), 4437-4443. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0143>
- Hussain, M., Corcoran, C., Sibilla, C., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Mateo, J., Olmos, D., Mehra, N., Kolinsky, M. P., Roubaud, G., Ozguroglu, M., Matsubara, N., Gedye, C., Choi, Y. D., Padua, C., Kohlmann, A., Huisden, R., . . . de Bono, J. (2022). Tumor Genomic Testing for >4,000 Men with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Phase III Trial PROfound



- 
- (Olaparib). *Clin Cancer Res*, 28(8), 1518-1530. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3940>
- Incorvaia L, Puglisi M, Maruzzo M, Mammone G, Caffo O, Procopio G, Antonuzzo L, Rizzo M, Conteduca V, Messina C, Scagliarini S, Maiorano B, Santoni M, Facchini G, Lipari H, Formisano L, Stellato M, Basso U, Rossetti S, Lai E, Arcara CC, Bronte E, Bazan Russo TD, Colletta G, Gristina V, Pepe F, Malapelle U, Santini D, Depetris I, Di Maio M, Badalamenti G, Bracarda S, Russo A. Homologous recombination repair genetic testing variables and diagnostic paths for prostate cancer patients: a multicenter cohort study. *Oncologist*. 2025 Dec 1;30(12):oyaf395. doi: 10.1093/oncolo/oyaf395. PMID: 41330714.
- Jaiswal, S. (2020). Clonal hematopoiesis and nonhematologic disorders. *Blood*, 136(14), 1606-1614. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000989>
- Jensen, K., Konnick, E. Q., Schweizer, M. T., Sokolova, A. O., Grivas, P., Cheng, H. H., Klemfuss, N. M., Beightol, M., Yu, E. Y., Nelson, P. S., Montgomery, B., & Pritchard, C. C. (2021). Association of Clonal Hematopoiesis in DNA Repair Genes With Prostate Cancer Plasma Cell-free DNA Testing Interference. *JAMA Oncol*, 7(1), 107-110. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.5161>
- Lockwood, C. M., Borsu, L., Cankovic, M., Earle, J. S. L., Gocke, C. D., Hameed, M., Jordan, D., Lopategui, J. R., Pullambhatla, M., Reuther, J., Rumilla, K. M., Tafe, L. J., Temple-Smolkin, R. L., Terraf, P., & Tsimberidou, A. M. (2023). Recommendations for Cell-Free DNA Assay Validations: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*, 25(12), 876-897. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2023.09.004>
- Malapelle, U.; Tiseo, M.; Vivancos, A.; Kapp, J.; Serrano, M.J.; Tiemann, M. Liquid Biopsy for Biomarker Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: A European Perspective. *J. Mol. Pathol.* 2021, 2, 255-273. <https://doi.org/10.3390/jmp2030022>
- Mateo, J., Boysen, G., Barbieri, C. E., Bryant, H. E., Castro, E., Nelson, P. S., Olmos, D., Pritchard, C. C., Rubin, M. A., & de Bono, J. S. (2017). DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications. *Eur Urol*, 71(3), 417-425. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.037>
- Nakamura, Y., Okamoto, W., Kato, T., Esaki, T., Kato, K., Komatsu, Y., Yuki, S., Masuishi, T., Nishina, T., Ebi, H., Sawada, K., Taniguchi, H., Fuse, N., Nomura, S., Fukui, M., Matsuda, S., Sakamoto, Y., Uchigata, H., Kitajima, K., . . . Yoshino, T. (2021). Circulating tumor DNA-guided treatment with pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *Nat Med*, 27(11), 1899-1903. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01553-w>
- Normanno, N., Cervantes, A., Ciardiello, F., De Luca, A., & Pinto, C. (2018). The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. *Cancer Treat Rev*, 70, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.007>
- Normanno N, Esposito Abate R, Lambiase M, Forgione L, Cardone C, Iannaccone A, Sacco A, Rachiglio AM, Martinelli E, Rizzi D, Pisconti S, Biglietto M, Bordonaro R, Troiani T, Latiano TP, Giuliani F, Leo S, Rinaldi A, Maiello E, Ciardiello F; CAPRI-GOIM Investigators. RAS testing of liquid biopsy correlates with the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus cetuximab in the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol*. 2018 Jan 1;29(1):112-118. doi: 10.1093/annonc/mdx417. PMID: 28950295.
- Pascual, J., Attard, G., Bidard, F. C., Curigliano, G., De Mattos-Arruda, L., Diehn, M., Italiano, A.,



- Lindberg, J., Merker, J. D., Montagut, C., Normanno, N., Pantel, K., Pentheroudakis, G., Popat, S., Reis-Filho, J. S., Tie, J., Seoane, J., Tarazona, N., Yoshino, T., & Turner, N. C. (2022). ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*, 33(8), 750-768. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.05.520>
- Perez-Barrios, C., Nieto-Alcolado, I., Torrente, M., Jimenez-Sanchez, C., Calvo, V., Gutierrez-Sanz, L., Palka, M., Donoso-Navarro, E., Provencio, M., & Romero, A. (2016). Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Res*, 5(6), 665-672. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.12.03>
- Powles, T., Assaf, Z. J., Davarpanah, N., Banchereau, R., Szabados, B. E., Yuen, K. C., Grivas, P., Hussain, M., Oudard, S., Gschwend, J. E., Albers, P., Castellano, D., Nishiyama, H., Daneshmand, S., Sharma, S., Zimmermann, B. G., Sethi, H., Aleshin, A., Perdicchio, M., . . . Mariathasan, S. (2021). ctDNA guiding adjuvant immunotherapy in urothelial carcinoma. *Nature*, 595(7867), 432-437. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03642-9>
- Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, Garofalo A, Gulati R, Carreira S, Eeles R, Elemento O, Rubin MA, Robinson D, Lonigro R, Hussain M, Chinnaiyan A, Vinson J, Filipenko J, Garraway L, Taplin ME, AlDubayan S, Han GC, Beightol M, Morrissey C, Nghiem B, Cheng HH, Montgomery B, Walsh T, Casadei S, Berger M, Zhang L, Zehir A, Vijai J, Scher HI, Sawyers C, Schultz N, Kantoff PW, Solit D, Robson M, Van Allen EM, Offit K, de Bono J, Nelson PS. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Aug 4;375(5):443-53. doi: 10.1056/NEJMoa1603144. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27433846; PMCID: PMC4986616.
- Procaccio, L., Bergamo, F., Daniel, F., Rasola, C., Munari, G., Biason, P., Crucitta, S., Barsotti, G., Zanella, G., Angerilli, V., Magro, C., Paccagnella, S., Di Antonio, V., Loupakis, F., Danesi, R., Zagonel, V., Del Re, M., Lonardi, S., & Fassan, M. (2021). A Real-World Application of Liquid Biopsy in Metastatic Colorectal Cancer: The Poseidon Study. *Cancers (Basel)*, 13(20). <https://doi.org/10.3390/cancers13205128>
- Rachiglio, A. M., Esposito Abate, R., Sacco, A., Pasquale, R., Fenizia, F., Lambiase, M., Morabito, A., Montanino, A., Rocco, G., Romano, C., Nappi, A., Iaffaioli, R. V., Tatangelo, F., Botti, G., Ciardiello, F., Maiello, M. R., De Luca, A., & Normanno, N. (2016). Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. *Oncotarget*, 7(41), 66595-66605. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10704>
- Reinert, T., Henriksen, T. V., Christensen, E., Sharma, S., Salari, R., Sethi, H., Knudsen, M., Nordentoft, I., Wu, H. T., Tin, A. S., Heilskov Rasmussen, M., Vang, S., Shchegrova, S., Frydendahl Boll Johansen, A., Srinivasan, R., Assaf, Z., Balcioglu, M., Olson, A., Dashner, S., . . . Lindbjerg Andersen, C. (2019). Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*, 5(8), 1124-1131. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.0528>
- Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y. M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J. M., Montgomery, B., Taplin, M. E., Pritchard, C. C., Attard, G., Beltran, H., Abida, W., Bradley, R. K., Vinson, J., Cao, X., Vats, P., Kunju, L. P., Hussain, M., Feng, F. Y., . . . Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5), 1215-1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001>
- Ruglioni, M., Petrini, I., Crucitta, S., Sbrana, A., Luculli, G. I., Sadeghi Gol, L., Forte, C., Chella, A., Rolfo,

- C., Danesi, R., & Del Re, M. (2025). Clinical characteristics of EGFR-ctDNA shedders in EGFR-mutant NSCLC patients. *Transl Oncol*, 52, 102228. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.102228>
- Russo, A., Incorvaia, L., Capoluongo, E., Tagliaferri, P., Gori, S., Cortesi, L., Genuardi, M., Turchetti, D., De Giorgi, U., Di Maio, M., Barberis, M., Dessena, M., Del Re, M., Lapini, A., Luchini, C., Jereczek-Fossa, B. A., Sapino, A., Cinieri, S., & Italian Scientific, S. (2022). Implementation of preventive and predictive BRCA testing in patients with breast, ovarian, pancreatic, and prostate cancer: a position paper of Italian Scientific Societies. *ESMO Open*, 7(3), 100459. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100459>
- Sartore-Bianchi, A., Pietrantonio, F., Lonardi, S., Mussolin, B., Rua, F., Crisafulli, G., Bartolini, A., Fenocchio, E., Amatu, A., Manca, P., Bergamo, F., Tosi, F., Mauri, G., Ambrosini, M., Daniel, F., Torri, V., Vanzulli, A., Regge, D., Cappello, G., . . . Bardelli, A. (2022). Circulating tumor DNA to guide rechallenge with panitumumab in metastatic colorectal cancer: the phase 2 CHRONOS trial. *Nat Med*, 28(8), 1612-1618. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01886-0>
- Schagerholm, C., Robertson, S., Toosi, H., Sifakis, E. G., & Hartman, J. (2024). PIK3CA mutations in endocrine-resistant breast cancer. *Sci Rep*, 14(1), 12542. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62664-1>
- Siravegna, G., Sartore-Bianchi, A., Nagy, R. J., Raghav, K., Odegaard, J. I., Lanman, R. B., Trusolino, L., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2019). Plasma HER2 (ERBB2) Copy Number Predicts Response to HER2-targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*, 25(10), 3046-3053. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3389>
- Stintzing, S., Klein-Scory, S., Fischer von Weikersthal, L., Fuchs, M., Kaiser, F., Heinrich, K., Modest, D. P., Hofheinz, R. D., Decker, T., Gerger, A., Angermeier, S., Rumpold, H., Dickhut, A., Ohler, L., Gruenberger, B., Niedersuess-Beke, D., Sandmann, M., Winder, T., Trojan, J., . . . Heinemann, V. (2025). Baseline Liquid Biopsy in Relation to Tissue-Based Parameters in Metastatic Colorectal Cancer: Results From the Randomized FIRE-4 (AIO-KRK-0114) Study. *J Clin Oncol*, 43(12), 1463-1473. <https://doi.org/10.1200/JCO.24.01174>
- Stout LA, Kassem N, Hunter C, Philips S, Radovich M, Schneider BP. Identification of germline cancer predisposition variants during clinical ctDNA testing. *Sci Rep*. 2021 Jul 1;11(1):13624. doi: 10.1038/s41598-021-93084-0.
- Turner NC, Oliveira M, Howell SJ, Dalenc F, Cortes J, Gomez Moreno HL, Hu X, Jhaveri K, Krivorotko P, Loibl S, Morales Murillo S, Okera M, Park YH, Sohn J, Toi M, Tokunaga E, Yousef S, Zhukova L, de Bruin EC, Grinsted L, Schiavon G, Foxley A, Rugo HS; CAPItello-291 Study Group. Capivasertib in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2023 Jun 1;388(22):2058-2070. doi: 10.1056/NEJMoa2214131
- Chen H, An Y, Wang C, Zhou J. Circulating tumor DNA in colorectal cancer: biology, methods and applications. *Discov Oncol*. 2025 Apr 1;16(1):439. doi: 10.1007/s12672-025-02220-z.
- Tarazona, N., Gimeno-Valiente, F., Gambardella, V., Zuniga, S., Rentero-Garrido, P., Huerta, M., Rosello, S., Martinez-Ciarpaglini, C., Carbonell-Asins, J. A., Carrasco, F., Ferrer-Martinez, A., Bruixola, G., Fleitas, T., Martin, J., Tebar-Martinez, R., Moro, D., Castillo, J., Espi, A., Roda, D., & Cervantes, A. (2019). Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol*, 30(11), 1804-1812. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz390>

- 
- Tie, J., Lo, S. N., & Gibbs, P. (2022). Circulating Tumor DNA Guiding Adjuvant Therapy in Colon Cancer. Reply. *N Engl J Med*, 387(8), 760. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2209374>
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., Silliman, N., Tacey, M., Wong, H. L., Christie, M., Kosmider, S., Skinner, I., Wong, R., Steel, M., Tran, B., Desai, J., Jones, I., Haydon, A., Hayes, T., . . . Gibbs, P. (2016). Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*, 8(346), 346ra392. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6219>
- Tukachinsky, H., Madison, R. W., Chung, J. H., Gjoerup, O. V., Severson, E. A., Dennis, L., Fendler, B. J., Morley, S., Zhong, L., Graf, R. P., Ross, J. S., Alexander, B. M., Abida, W., Chowdhury, S., Ryan, C. J., Fizazi, K., Golsorkhi, T., Watkins, S. P., Simmons, A., . . . Oxnard, G. R. (2021). Genomic Analysis of Circulating Tumor DNA in 3,334 Patients with Advanced Prostate Cancer Identifies Targetable BRCA Alterations and AR Resistance Mechanisms. *Clin Cancer Res*, 27(11), 3094-3105. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4805>
- Ungerer, V., Bronkhorst, A. J., & Holdenrieder, S. (2020). Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 57(7), 484-507. <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1750558>
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., Ciardiello, F., D'Hoore, A., Diaz-Rubio, E., Douillard, J. Y., Ducreux, M., Falcone, A., Grothey, A., Gruenberger, T., Haustermans, K., . . . Arnold, D. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 27(8), 1386-1422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>
- Vogel, A., Bridgewater, J., Edeline, J., Kelley, R. K., Klumpen, H. J., Malka, D., Primrose, J. N., Rimassa, L., Stenzinger, A., Valle, J. W., Ducreux, M., & clinicalguidelines@esmo.org, E. G. C. E. a. (2023). Biliary tract cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 34(2), 127-140. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.506>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 9236-9241. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>
- Wang, M., Huang, X., Li, X., Guo, Q., Xu, W., Zhao, M., Wang, X., Wang, L., & Lou, J. (2021). Performance comparison of commercial kits for isolating and detecting circulating tumor DNA. *Scand J Clin Lab Invest*, 81(4), 276-281. <https://doi.org/10.1080/00365513.2020.1821394>
- Watanabe, K., Nakamura, Y., & Low, S. K. (2021). Clinical implementation and current advancement of blood liquid biopsy in cancer. *J Hum Genet*, 66(9), 909-926. <https://doi.org/10.1038/s10038-021-00939-5>
- Zhang, B. O., Xu, C. W., Shao, Y., Wang, H. T., Wu, Y. F., Song, Y. Y., Li, X. B., Zhang, Z., Wang, W. J., Li, L. Q., & Cai, C. L. (2015). Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation. *Exp Ther Med*, 9(4), 1383-1388. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2221>
- Zhang, Y., Yao, Y., Xu, Y., Li, L., Gong, Y., Zhang, K., Zhang, M., Guan, Y., Chang, L., Xia, X., Li, L., Jia, S., & Zeng, Q. (2021). Pan-cancer circulating tumor DNA detection in over 10,000 Chinese patients. *Nat Commun*, 12(1), 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20162-8>