



Con il Patrocinio di:



L'INTRODUZIONE della BIOPSIA LIQUIDA nella DIAGNOSTICA ONCOLOGICA

DIRETTORI DEL CORSO

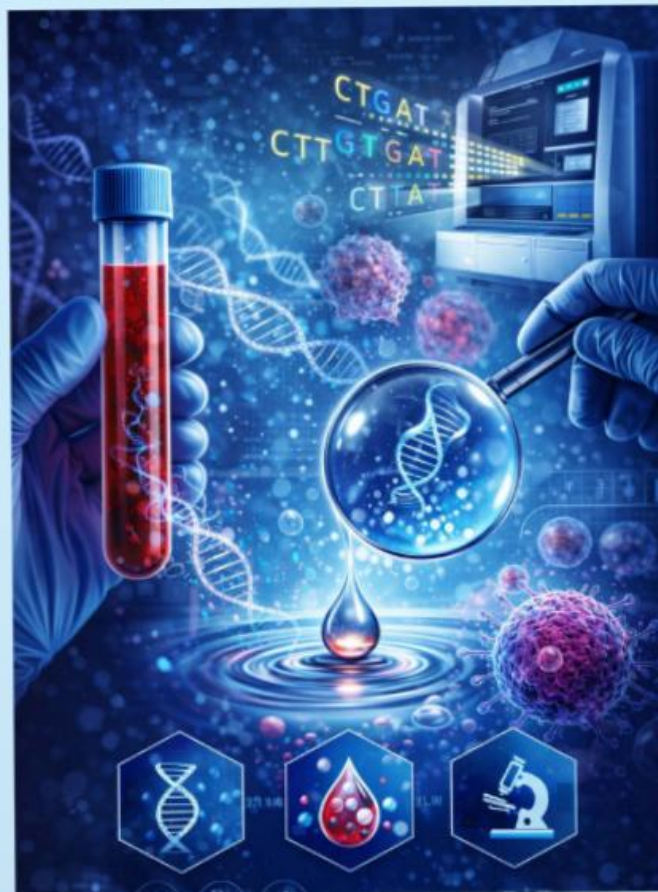
Paola Francia di Celle
Maria Scatolini
Tiziana Venesio
Marco Volante

Coordinatori GdS Patologia Molecolare
Rete Oncologica

SEDE

AULA LENTI
Ingresso da Corso Bramante 88 - TORINO

dream-adv.it



Problematiche preanalitiche A. Listi

1. APERTURA — IL FALSO MITO

BASTA FARE UNA LIQUID BIOPSY.

LA LIQUID BIOPSY HA CAMBIATO L'ONCOLOGIA MOLECOLARE.
MA LA VERA SFIDA OGGI

NON È PIÙ ESEGUIRE IL TEST.

È RENDERLO

**AFFIDABILE, RIPRODUCIBILE
E CLINICAMENTE INTERPRETABILE.**

LABORATORIO A

RISULTATO
EGFR L858R
RILEVATO

DECISIONE TERAPEUTICA
PRESA.

LABORATORIO B

RISULTATO
EGFR L858R
NON RILEVATO

DECISIONE TERAPEUTICA
DIVERSA.

DUE LABORATORI. STESSO PLASMA.
RISULTATI DIVERSI.

IL PROBLEMA NON È IL TEST.
È L'INCERTEZZA.



????

- Perché un driver tissutale presente nel tumore può non essere identificato nel plasma?
- ... due laboratori possono ottenere risultati differenti partendo dallo stesso campione biologico?
- ... la tumor fraction sta diventando un biomarcatore?

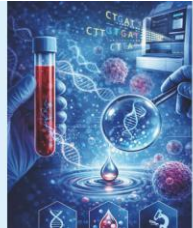
COSA NEL 2026
DETERMINA LA
PERFORMANCE
DIAGNOSTICA DELLA
BIOPSIA LIQUIDA



DECISIONE
TERAPEUTICA
AFFIDABILE QUANTO
IL RISULTATO
MOLECOLARE SU CUI
SI BASA



L'INTRODUZIONE della BIOPSIA LIQUIDA nella DIAGNOSTICA ONCOLOGICA



TORINO
8 GIUGNO 2026
AULA LENTI
Presidio Molinette

Determinanti della performance diagnostica:

- 1 Il problema biologico e il problema del campione**
- 2** Basso abbondanza del ctDNA
rischio di falsi negativi
provetta, timing, trasporto, centrifugazione
contaminazione da DNA leucocitario

Il problema analitico

- 3** sensibilità, LoD, VAF, tumor fraction
differenze tra dPCR e NGS

Il problema interpretativo

negativo non sempre informativo
CHIP, varianti germinali, contesto clinico



La performance clinica di un test di biopsia liquida non è determinata da un singolo strumento.

È il risultato dell'interazione tra:



Per comprendere realmente il valore della biopsia liquida dobbiamo quindi partire dall'analisi stesso:

→ **il ctDNA**
Circulating Tumor DNA

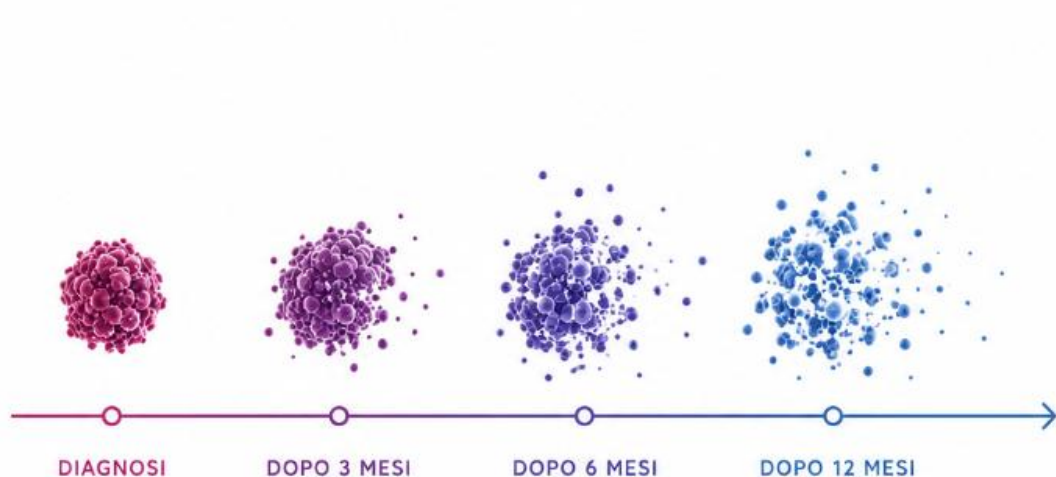


IL TUMORE
NON È STATICO.

CAMBIA.
SI ADATTA.
EVOLVE.

La biopsia tradizionale
osserva un **istante**.

La **biopsia liquida**
prova a osservare
il **movimento**.



L'INTRODUZIONE della BIOPSIA LIQUIDA nella DIAGNOSTICA ONCOLOGICA



TORINO
8 GIUGNO 2026
AULA LENTI
Presidio Molinette



"Negli ultimi dieci anni la biopsia liquida è passata da strumento complementare a componente centrale della medicina di precisione

- IDENTIFICARE MUTAZIONI
- MONITORARE LA MALATTIA
- INTERCETTARE RESISTENZE (es. serena-6 trials cambia terapia quando emerge mutazione molecolare in ctDNA)

...IN RICERCA TRASLAZIONALE MRD E STADI PRECOCI

cancer, Pages 53–64. Copyright Elsevier (2022).

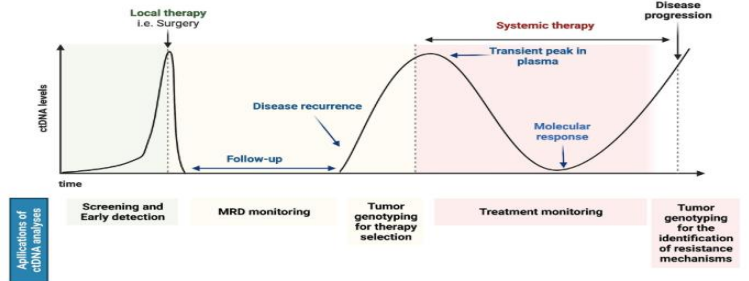


TABLE 1. Daily practice adoption of ctDNA in solid tumours.

Tumour type	Clinical adoption
NSCLC	<i>EGFR</i> mutations
	<i>ALK</i> rearrangements
	<i>ROS1</i> rearrangements
	<i>BRAF</i> mutations
	<i>RET</i> rearrangements
	<i>MET</i> alterations
	<i>HER2</i> mutations
HR+ HER2- breast cancer	<i>PIK3CA</i> mutations
	<i>ESR1</i> mutations
CRC	<i>SEPT9</i> methylation
Prostate cancer	HRD

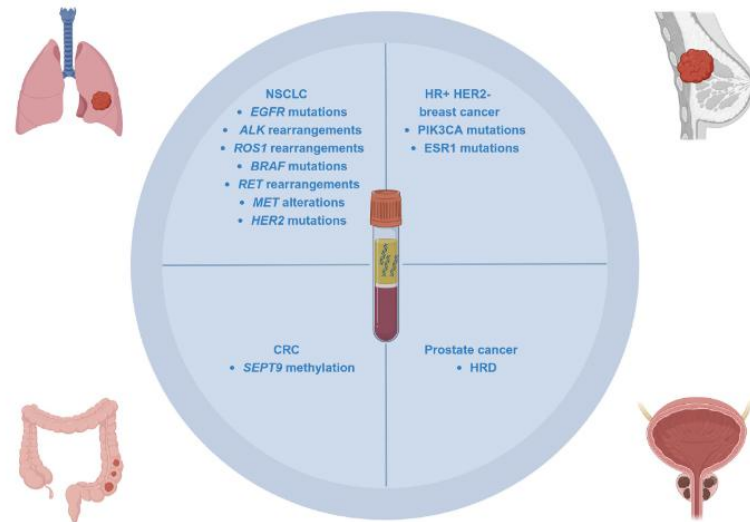


FIGURE 1 | Daily practice adoption of ctDNA in solid tumours. This figure was created with BioRender (<https://biorender.com>) (accessed on 03 January 2025). *ALK*, Anaplastic Lymphoma Kinase; *BRAF*, V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homologue B1; CRC, colo-rectal cancer; ctDNA, circulating tumour DNA; *EGFR*, Epidermal Growth Factor Receptor; *ESR1*, Oestrogen Receptor 1; *HER2*, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; HR, hormone receptor; HRD, homologous recombination deficiency; *KRAS*, Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue; *MET*, MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase; NSCLC, non-small cell lung cancer; *PIK3CA*, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha; *ROS1*, ROS Proto-Oncogene 1 Receptor Tyrosine Kinase; *RET*, REarranged during Transfection; *SEPT9*, septin9.

Categoria

Esempio

Target selection

EGFR, ALK, ROS1, RET, MET, HER2, PIK3CA, HRD

Resistance monitoring

ESR1, EGFR T790M, KRAS emergente

Screening / Early detection

SEPT9 methylation

MRD

ctDNA post-chirurgia

Disease monitoring

variazioni quantitative del ctDNA



"Per anni abbiamo interpretato la biopsia liquida in modo binario.

MUTAZIONE PRESENTE.

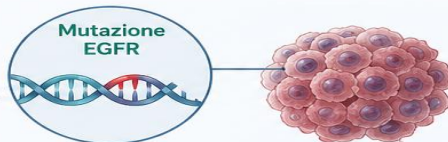
MUTAZIONE ASSENTE.

Oggi sappiamo che questa interpretazione è incompleta.

Perché un risultato negativo può significare due cose completamente diverse.

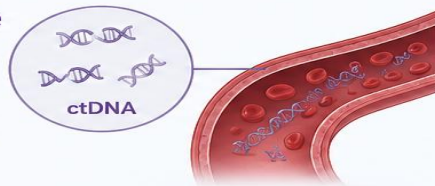
1 La presenza della mutazione.

La mutazione (es. EGFR) può essere presente nel DNA delle cellule tumorali.



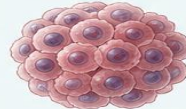
2 La capacità del tumore di rilasciare ctDNA nel sangue.

Il tumore deve rilasciare frammenti di DNA tumorale (ctDNA) nel circolo sanguigno in quantità sufficiente per essere rilevati.



POSSONO COINCIDERE

Tumore EGFR-mutato



Rilascio adeguato di ctDNA



RISULTATO POSITIVO

NON COINCIDONO NECESSARIAMENTE

Tumore EGFR-mutato



Rilascio insufficiente di ctDNA



RISULTATO NEGATIVO

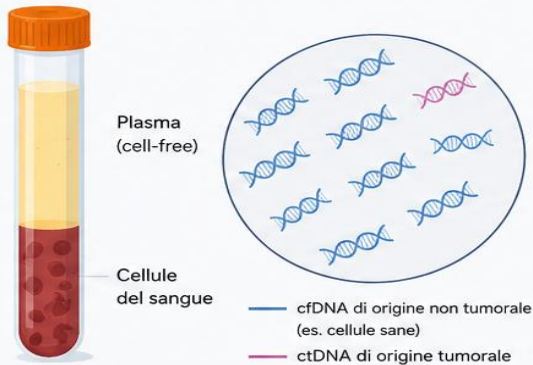
Quando e perché una biopsia liquida può dare esito negativo?

1) Biologia del tumore

PERCHÉ È COSÌ CRITICA NELLA BIOPSIA LIQUIDA

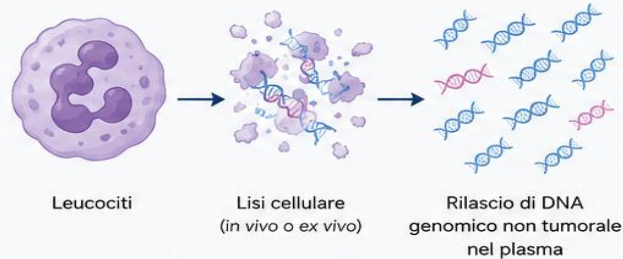
La biopsia liquida si basa sull'analisi del **DNA tumorale circolante (ctDNA)** presente nel plasma. Tuttavia, la sua rilevazione è estremamente sfidante per ragioni biologiche e tecniche.

1 Il ctDNA rappresenta solo una minima frazione del cfDNA totale



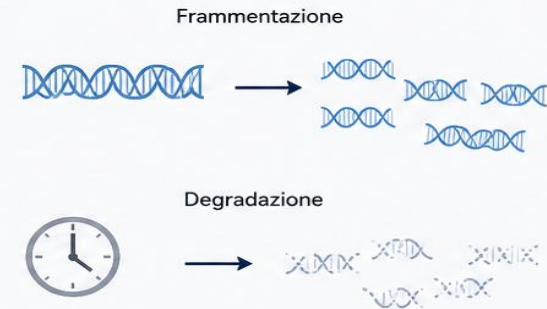
Il ctDNA può costituire <math><0,1-1\%</math> del cfDNA totale, soprattutto nelle fasi precoci di malattia.

2 La lisi cellulare e il rilascio di DNA genomico da leucociti possono diluire il segnale tumorale e aumentare il rischio di falsi negativi



Il DNA rilasciato dai leucociti diluisce ulteriormente il ctDNA, riducendone la frazione allelica e aumentando il rischio di falsi negativi, in particolare quando le mutazioni sono a bassa frequenza.

3 Il ctDNA è altamente frammentato e soggetto a degradazione



Il ctDNA ha una lunghezza media di ~150–200 bp ed è rapidamente degradato da nucleasi, il che rende critica la pre-analitica e limita la finestra temporale utile per l'analisi.



In sintesi: la bassa abbondanza, la diluizione da DNA non tumorale e la natura instabile del ctDNA rendono la **biopsia liquida una tecnologia estremamente potente, ma anche altamente critica e complessa.**

L'INTRODUZIONE della BIOPSIA LIQUIDA nella DIAGNOSTICA ONCOLOGICA



TORINO
8 GIUGNO 2026
AULA LENTI
Presidio Molinette

Uno degli aspetti più rivoluzionari del **ctDNA** è la sua **emivita** estremamente breve.



Parliamo di **minuti o poche ore**.



EMIVITA DEL ctDNA
—
MINUTI
O POCHE ORE

Questo significa che il **ctDNA** non è un biomarcatore statico.

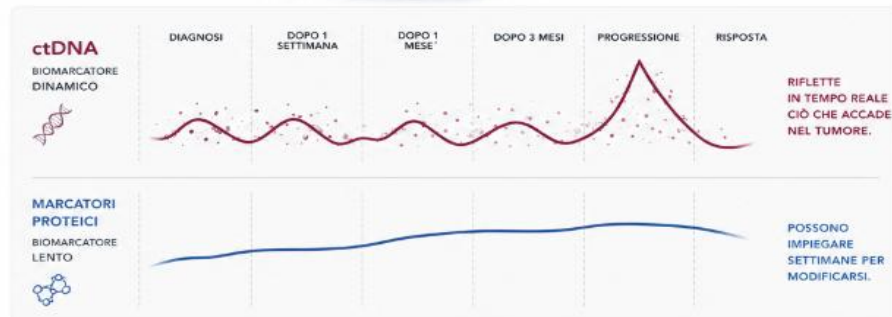
È dinamico.

Mentre i marcatori proteici possono impiegare **settimane** per modificarsi, il **ctDNA** può riflettere in **tempo reale** ciò che sta accadendo nel tumore.

Ed è qui che cambia completamente il paradigma.

Non osserviamo più soltanto il tumore.

Osserviamo la sua **evoluzione biologica**.



Il **ctDNA** ci permette di passare da un'istantanea a un **film in tempo reale** della biologia del tumore.

Il problema biologico

Fattori associati ad alto shedding

ctDNA release ALTO

elevato burden tumorale

metastasi epatiche

metastasi multifocali

elevata proliferazione cellulare

necrosi tumorale

In questi pazienti la probabilità di intercettare alterazioni genomiche è molto elevata.

ctDNA release BASSO

malattia intratoracica confinata

tumori di piccole dimensioni

metastasi encefaliche isolate

metastasi ossee predominanti

basso burden tumorale

Questi sono i pazienti nei quali il rischio di falsi negativi aumenta significativamente.



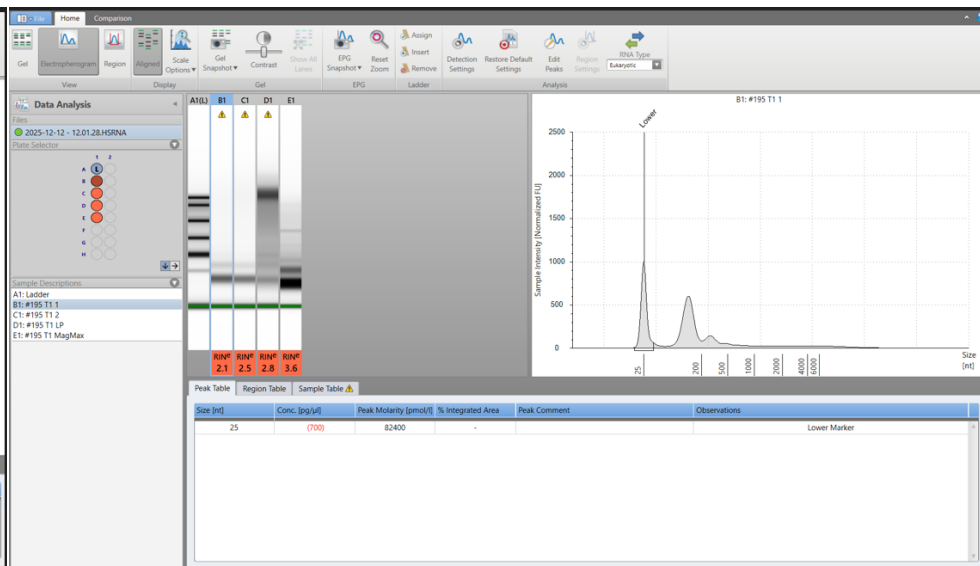
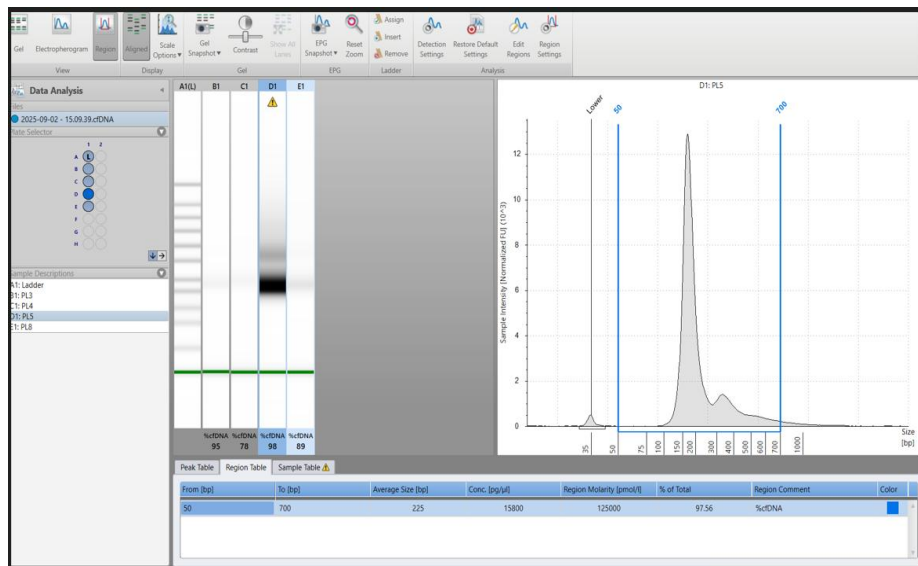
L'INTRODUZIONE della BIOPSIA LIQUIDA nella DIAGNOSTICA ONCOLOGICA



TORINO
8 GIUGNO 2026
AULA LENTI
Presidio Molinette

Biopsia liquida: tumour MAMMELLA (ng/μl14)

tumore POLMONE (ng/μl0.3)



Preanalytical variability starts before sequencing. Screen tapestation (valutazione in elettroforesi)

Quando e perché una biopsia liquida può dare esito negativo?

2) Qualità preanalitica

La fase pre-analitica: 10 anni di standardizzazione

Perché è stata necessaria?

- Il ctDNA è un analita raro, instabile e altamente vulnerabile alle variabili preanalitiche.
- Differenze in prelievo, trasporto, centrifugazione e conservazione possono modificare significativamente il risultato molecolare.
- Lo stesso campione può generare risultati diversi in laboratori diversi se i processi non sono armonizzati.

Il contributo delle Società Scientifiche

- Definizione di procedure condivise per raccolta, trasporto e processamento del campione.
- Introduzione di requisiti di qualità e tracciabilità.
- Armonizzazione dei workflow tra laboratori.
- Promozione di controlli di qualità intra- ed inter-laboratorio.

Impatto clinico

Standardizzazione preanalitica



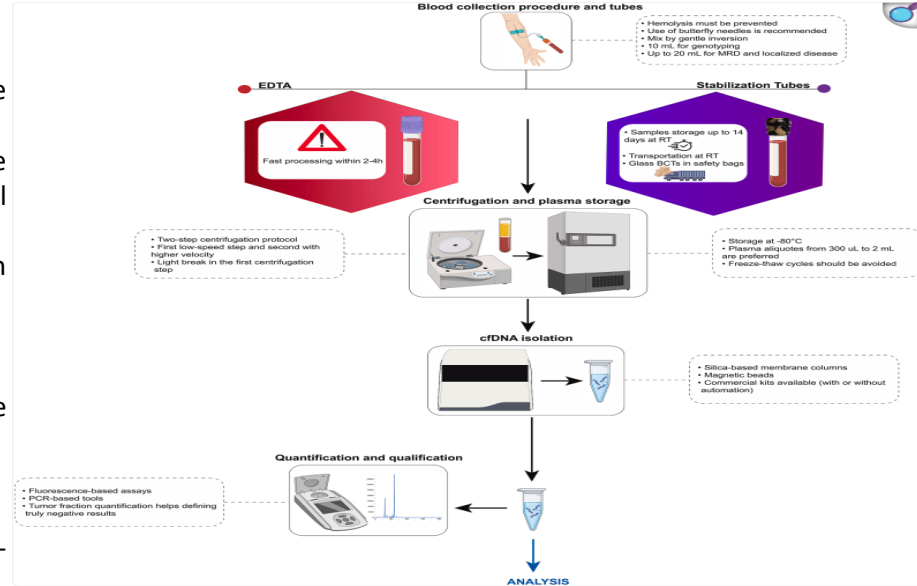
Risultato molecolare affidabile



Identificazione corretta delle alterazioni actionable



Scelta terapeutica appropriata



Workflow of liquid biopsy pre-analytical steps and recommendations for circulating tumor DNA (ctDNA) analysis. MRD, Minimal residual disease; RT, Room temperature; ctDNA, Circulating-free DNA.

[View full-text article in PMC](#)

► [J Liq Biopsy. 2025 May 24;8:100301. doi: 10.1016/j.jlb.2025.100301](#)

► [Copyright and License information](#)

INDICAZIONI OPERATIVE STANDARDIZZATE

per l'esecuzione dei test
su DNA tumorale circolante



Liquid Biopsy: Fase Pre-Analitica

Prelievo e trasporto

- Sangue raccolto in provette **EDTA/citrato** o con conservanti specifici
- Processazione entro **1-2 ore** dal prelievo
- Se ritardata: utilizzare provette stabilizzanti (max **3 giorni**)

Isolamento del plasma

- Metodo raccomandato: **double spin**
 - 2300 g × 10 min × 2
 - 4 °C, senza freno
- Ottenere almeno **2 mL di plasma**

Conservazione

- Breve termine: **-20 °C**
- Lungo termine: **-80 °C**
- Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo

Documentazione: **ogni spedizione deve essere accompagnata da una scheda di invio del campione, contenente data e ora del prelievo (che possono essere alternativamente indicate sull'etichetta della provetta), identificativo del paziente, tipo di provetta utilizzata ed eventuali annotazioni circa eventuali difformità. Inoltre, deve essere accompagnato dal foglio di richiesta in cui riportare la richiesta clinica e le principali informazioni relative al paziente (come ad esempio il trattamento eseguito).**

Azioni correttive: **in caso di ritardi, esposizione a temperature non controllate, o uso improprio di provette, il campione deve essere registrato come "non conforme" e gestito secondo le procedure di qualità (eventuale analisi tecnica, scarto, o ripetizione del prelievo).**

1.4 RICEZIONE IN LABORATORIO Verifica integrità provette e corrispondenza. **Registrazione nel LIMS. Se non idoneo: sospensione e notifica.**

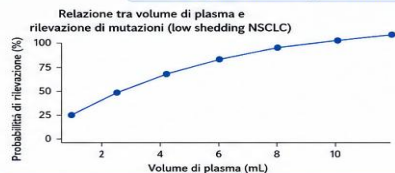
L'INTRODUZIONE della BIOPSIA LIQUIDA nella DIAGNOSTICA ONCOLOGICA



TORINO
8 GIUGNO 2026
AULA LENTI
Presidio Molinette

VOLUME PLASMA

più volume = più sensibilità.

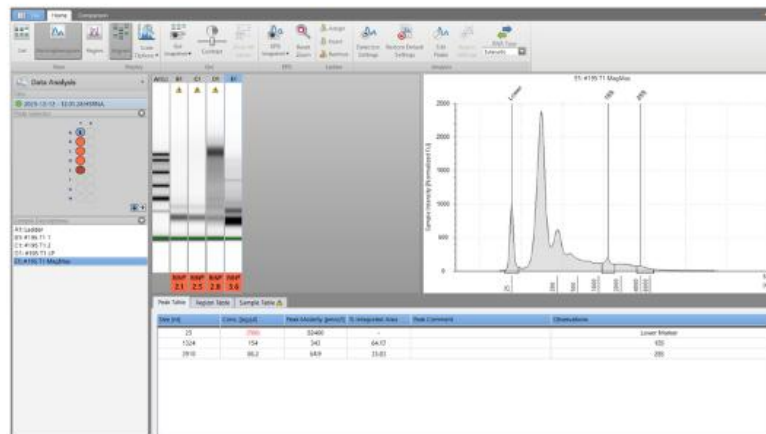
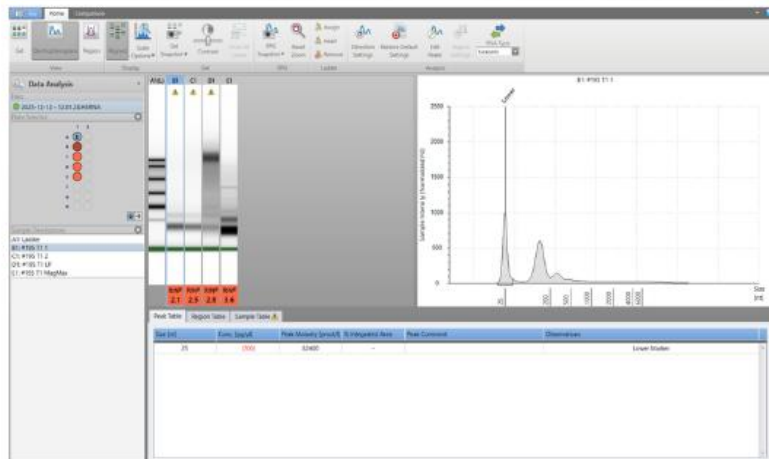


- ✓ Più volume di plasma analizzato = maggiore quantità di ctDNA/evDNA
- ✓ Aumenta la probabilità di rilevare mutazioni a bassa frequenza
- ✓ Cruciale nei pazienti low shedding (es. NSCLC)

Massimizzare il volume di plasma è fondamentale per la sensibilità.

Lo stesso campione biologico può generare output diversi a seconda del workflow preanalitico ed estrattivo.

preanalitica è essenziale per garantire risultati affidabili e riproducibili.



L'INTRODUZIONE della BIOPSIA LIQUIDA nella DIAGNOSTICA ONCOLOGICA



Analita	Informazione biologica
ctDNA	Genomica
cfRNA	Trascrittomica
Exosomi	Comunicazione cellulare
CTCs	Fenotipo tumorale
TEPs	Interazione ospite-tumore
Metaboliti	Stato funzionale

Dal punto di vista analitico il cfRNA presenta sfide maggiori rispetto al ctDNA.

Maggiore instabilità.
 Maggiore sensibilità alle variabili preanalitiche.
 Maggiore dipendenza dai tempi di processazione."

Il messaggio oggi non è tanto il failure rate assoluto. È che il ctRNA viene introdotto proprio per compensare alcune limitazioni del ctDNA. Ad esempio il trial LIQUIK e altri studi recenti mostrano che: ctRNA migliora il rilevamento di fusioni aumenta l'identificazione di ALK
 ROS1
 RET
 MET exon 14

"La domanda quindi diventa:

come possiamo distinguere un vero negativo da un negativo non informativo?

Driver negativo + TF <1%
 Negativo non informativo
 ↓
 Priorità alla biopsia tissutale
 ↓
 Possibile driver missed

Driver negativo + TF ≥1%
 Alta probabilità di vero negativo
 ↓
 Possibile avviare rapidamente il trattamento
ctDNA TF ≥1%
PPA 98%
 (Positive Percent Agreement)
NPV 97%
 (Negative Predictive Value)
 Rolfo et al

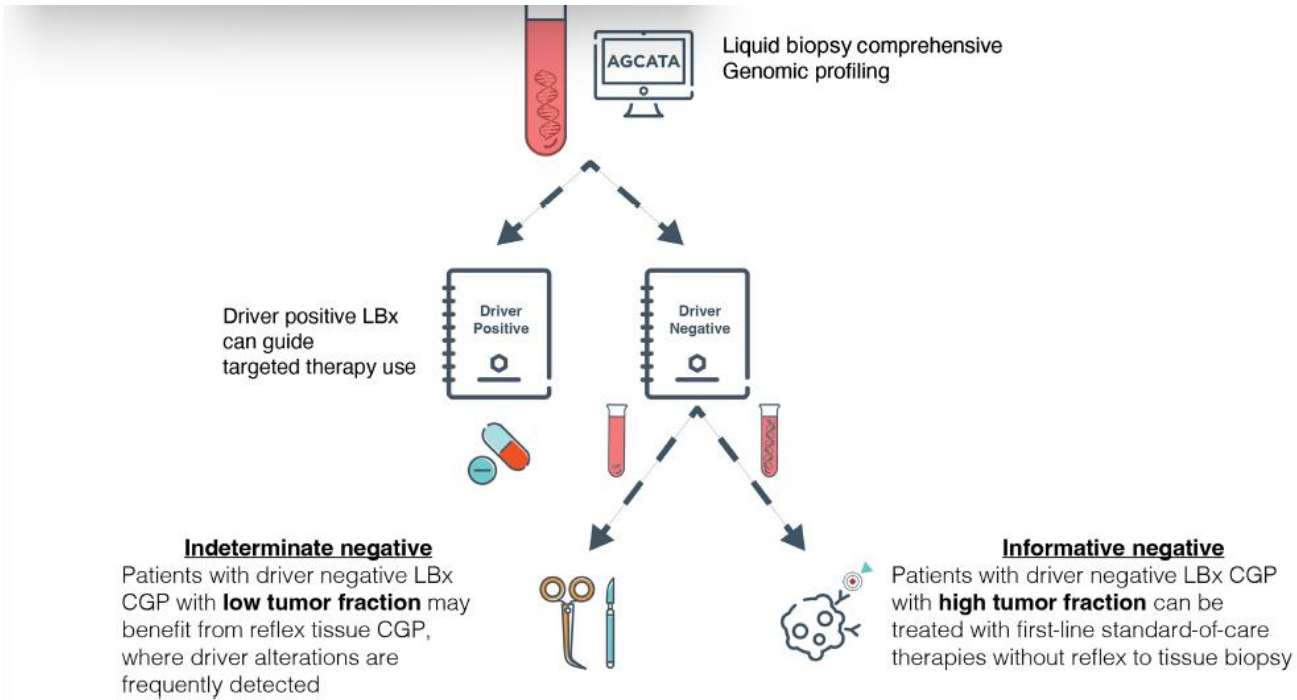
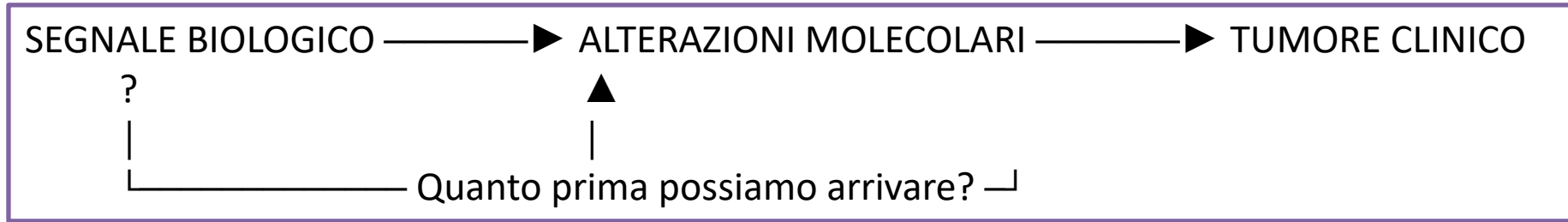


Figure 6. A clinical paradigm distinguishing actionable liquid biopsy results. For patients with liquid biopsy results, actionable drivers can guide targeted therapy use. Results that are negative for driver alterations can be distinguished by tumor fraction: a result with a low ctDNA TF (<1%) is an indeterminate negative where confirmatory tissue may likely reveal a driver alteration, whereas a result with high ctDNA TF (≥1%) is an informative negative that provides confidence in the true absence of driver alterations in the tumor.



Generazione

ctDNA

Tumor Fraction

Fragmentomics

Plasma proteomics

Obiettivo

rilevare il tumore

interpretare il risultato

identificare alterazioni precoci

identificare il rischio biologico

Cell 2026 di Swanton: 14 proteine in grado di predire il carcinoma polmonare oltre 5 anni prima della diagnosi clinica

Concludendo:

Standardizzazione della fase preanalitica:

- ✓ Corretta raccolta del campione ematico
- ✓ Tempi di processazione controllati
- ✓ Adeguata separazione del plasma
- ✓ Workflow di estrazione validato
- ✓ Controlli di qualità lungo l'intero processo

