



Figure S1. Results of spiking experiment with (a) SKBR3, (b) MCF7 and (c) Hs578T breast cancer cells and analysis of marker expression with qPCR. Relative gene expressions of CK19, SCGB2A2, EpCAM, EMP2, MAL2, PPIC, SLC6A8, HJURP and CCNE2 are shown in biological and technical replicates of 10, 100, 1000 tumor cells spiked into healthy donor blood. The bars depict the mean gene expression relative to an unspiked control sample, and the error bars the standard deviation.

Table S1. Characteristics of the 36 patients with metastatic breast cancer and positivity rates of each marker and panels. The associations of marker positivity and patients' characteristics were evaluated using a Fisher's exact test or a chi-square test where appropriate (*). Unadjusted p-values are shown. TNBC triple negative breast cancer.

	<i>n</i>	Panel 1	CK19	SCGB2A2	EPCAM	Panel 2	EMP2	SLC6A8	HJURP	MAL2	PPIC	CCNE2
All patients	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean age (range), years	63.3 (30.3–82.6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathological subtype												
luminal	26	76,9 %	23,1 %	61,5 %	50,0 %	73,1 %	15,4 %	57,7 %	7,7 %	19,2 %	61,5 %	15,4 %
HER2-positive	4	50,0 %	0,0 %	50,0 %	25,0 %	75,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	75,0 %	0,0 %
TNBC	5	40,0 %	0,0 %	40,0 %	20,0 %	80,0 %	20,0 %	60,0 %	20,0 %	20,0 %	60,0 %	20,0 %
<i>p</i>		0.159	0.451	0.738	0.390	1.000	1.000	0.123	0.603	1.000	1.000	1.000
Number of treatment lines received												
0	8	75,0 %	12,5 %	75,0 %	12,5 %	62,5 %	0,0 %	37,5 %	0,0 %	12,5 %	50,0 %	12,5 %
1	12	58,3 %	8,3 %	58,3 %	33,3 %	66,7 %	16,7 %	58,3 %	16,7 %	8,3 %	58,3 %	16,7 %
>1	15	80,0 %	26,7 %	53,3 %	66,7 %	93,3 %	20,0 %	60,0 %	6,7 %	26,7 %	80,0 %	13,3 %
<i>p</i>		0.239	0.524	0.564	0.039	0.074	0.586	0.569	0.587	0.524	0.181	1.000
Number of metastasis sites												
1	18	72,2 %	11,1 %	55,6 %	50,0 %	77,8 %	11,1 %	55,6 %	5,6 %	16,7 %	55,6 %	11,1 %
>1	17	64,7 %	23,5 %	58,8 %	35,3 %	70,6 %	17,6 %	47,1 %	11,8 %	17,6 %	70,6 %	17,6 %
<i>p</i>		0.721*	0.391	0.709*	0.296*	0.706	0.650	0.739*	0.593	1.000	0.322*	0.650
Bone metastasis												
yes	30	66,7 %	20,0 %	60,0 %	36,7 %	70,0 %	13,3 %	50,0 %	6,7 %	13,3 %	60,0 %	10,0 %
no	5	80,0 %	0,0 %	40,0 %	80,0 %	100,0 %	20,0 %	60,0 %	20,0 %	40,0 %	80,0 %	40,0 %
<i>p</i>		1.000	0.561	0.631	0.141	0.297	0.561	0.528	0.380	0.195	0.630	0.139
Liver metastasis												
yes	10	80,0 %	30,0 %	60,0 %	50,0 %	70,0 %	20,0 %	60,0 %	20,0 %	30,0 %	60,0 %	20,0 %
no	25	64,0 %	12,0 %	56,0 %	40,0 %	76,0 %	12,0 %	48,0 %	4,0 %	12,0 %	64,0 %	12,0 %
<i>p</i>		0.447	0.322	1.000	0.712	0.694	0.610	0.711	0.190	0.322	1.000	0.610
Lung metastasis												
yes	12	58,3 %	8,3 %	50,0 %	33,3 %	75,0 %	8,3 %	25,0 %	8,3 %	8,3 %	75,0 %	16,7 %
no	23	73,9 %	21,7 %	60,9 %	47,8 %	73,9 %	17,4 %	65,2 %	8,7 %	21,7 %	56,5 %	13,0 %
<i>p</i>		0.451	0.640	0.721*	0.411*	1.000	0.640	0.035*	1.000	0.640	0.463	1.000
Brain metastasis												
yes	5	80,0 %	0,0 %	60,0 %	60,0 %	80,0 %	20,0 %	80,0 %	20,0 %	20,0 %	60,0 %	40,0 %
no	31	67,7 %	19,4 %	54,8 %	41,9 %	74,2 %	12,9 %	48,4 %	6,5 %	16,1 %	61,3 %	9,7 %
<i>p</i>		1.000	0.564	1.000	0.637	1.000	0.549	0.342	0.370	1.000	1.000	0.132

Table S2. Characteristics of the 90 patients with early breast cancer and positivity rates of each marker and panels. The associations of marker positivity and patients' characteristics were evaluated using a Fisher's exact test or a chi-square test where appropriate (*). Unadjusted p-values are shown. Bold p-values indicate significance after Bonferroni correction.

	<i>n</i>	Panel 1	CK19	SCGB2A2	EPCAM	Panel 2	EMP2	SLC6A8	HJURP	MAL2	PPIC	CCNE2
All patients	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean age (range), years	62.2 (26.9–91.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estrogen receptor												
positive (score 3–8)	71	22.5 %	12.7 %	8.5 %	8.5 %	25.4 %	8.5 %	16.9 %	4.2 %	2.8 %	5.6 %	9.9 %
negative (score 0–2)	13	7.7 %	0.0 %	7.7 %	0.0 %	15.4 %	7.7 %	7.7 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	7.7 %
<i>p</i>		0.451	0.343	1.000	0.584	0.724	1.000	0.681	1.000	1.000	1.000	1.000
Progesterone receptor												
positive (score 3–8)	63	19.0 %	11.1 %	7.9 %	7.9 %	25.4 %	9.5 %	17.5 %	3.2 %	3.2 %	6.3 %	9.5 %
negative (score 0–2)	21	23.8 %	9.5 %	9.5 %	4.8 %	19.0 %	4.8 %	9.5 %	4.8 %	0.0 %	0.0 %	9.5 %
<i>p</i>		0.755	1.000	1.000	1.000	0.769*	0.674	0.502	1.000	1.000	0.568	1.000
HER2 (IHC)¹												
positive	19	10.5 %	5.3 %	5.3 %	0.0 %	26.3 %	10.5 %	15.8 %	0.0 %	0.0 %	5.3 %	5.3 %
negative	36	30.6 %	13.9 %	11.1 %	16.7 %	25.0 %	8.3 %	13.9 %	8.3 %	5.6 %	5.6 %	19.4 %
<i>p</i>		0.180	0.653	0.649	0.083	1.000	1.000	1.000	0.544	0.539	1.000	0.239
Tumor grade												
1–2	52	13.5 %	7.7 %	3.8 %	7.7 %	26.7 %	7.7 %	17.3 %	0.0 %	1.9 %	1.9 %	5.8 %
3	30	33.3 %	16.7 %	16.7 %	6.7 %	23.1 %	10.0 %	13.3 %	10.0 %	3.3 %	10.0 %	16.7 %
<i>p</i>		0.047	0.276	0.094	1.000	0.792*	0.703	0.760	0.046	1.000	0.136	0.135
KI 67 label index												
<50 %	66	18.2 %	10.6 %	7.6 %	7.6 %	27.3 %	9.1 %	18.2 %	3.0 %	3.0 %	6.1 %	10.6 %
≥50 %	17	29.4 %	11.8 %	11.8 %	5.9 %	11.8 %	5.9 %	5.9 %	5.9 %	0.0 %	0.0 %	5.9 %
<i>p</i>		0.303	1.000	0.793	1.000	0.485	1.000	0.486	0.610	1.000	0.696	1.000
Lymphangioinvasion												
positive	8	25.0 %	12.5 %	12.5 %	0.0 %	12.5 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	12.5 %
negative	75	20.0 %	10.7 %	8.0 %	8.0 %	25.3 %	9.3 %	17.3 %	4.0 %	2.7 %	5.3 %	9.3 %
<i>p</i>		0.664	1.000	0.522	1.000	0.673	1.000	0.346	1.000	1.000	1.000	0.572
Relapse												
yes	6	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %
no	84	20.2 %	10.7 %	8.3 %	7.1 %	25.0 %	8.3 %	16.7 %	3.6 %	2.4 %	4.8 %	9.5 %
<i>p</i>		1.000	1.000	1.000	1.000	0.329	1.000	0.585	0.352	1.000	1.000	1.000

¹ASCO CAP 2018 HER2 Testing for Breast Cancer Guidelines; Patients with equivocal HER2 status (*n* = 28) were excluded from the analysis.