



ORIGINAL

Nueva técnica en el estudio del ganglio centinela: one step nucleic acid amplification. Nuestra experiencia

N. Ceberio Ganzarain^{a,*}, A. Landin Larrazabal^a, V. Canales Arrasate^a, A. López Picado^b, M. Cuadra Cestafe^a, J. Gorostiaga Ayastuy^a, J.L. Mendizábal Urizar^a y J.L. de Pablo Lozano^a

^a Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario de Araba, Vitoria-Gasteiz, España

^b Unidad de Investigación de Álava, Hospital Universitario de Araba, Vitoria-Gasteiz, España

Recibido el 21 de diciembre de 2011; aceptado el 18 de junio de 2012

Disponible en Internet el 11 de agosto de 2012

PALABRAS CLAVE

One step nucleic acid amplification;
Ganglio centinela;
Intraoperatoria;
Cáncer mama

KEYWORDS

One step nucleic acid amplification;
Sentinel node;
Intraoperative diagnosis;
Breast cancer

Resumen

Objetivo: Describir la experiencia de nuestra Unidad de Patología Mamaria tras la implantación de la técnica molecular OSNA para la detección del ganglio centinela axilar en pacientes con carcinoma de mama y comparar los datos obtenidos con la técnica previa mediante estudio histológico de rutina.

Material y métodos: Se compararon de manera retrospectiva 2 grupos de mujeres, uno de ellos de 148 pacientes con aplicación de técnica OSNA y el otro de 155 con estudio histológico habitual.

Resultados: El número de ganglios axilares afectados con el método OSNA es comparable con el método anatomopatológico de rutina utilizado previamente (36,1% en HE y 36,5% en OSNA). La sensación subjetiva de mayor número de micrometástasis con OSNA se descarta tras el estudio retrospectivo de ambos grupos (11,6% en HE y 12,2% en OSNA).

Conclusión: Se puede aceptar la implantación del método OSNA como una técnica sensible, segura y reproducible para el estudio intraoperatorio del ganglio centinela en el proceso del tratamiento quirúrgico del cáncer de mama. La necesidad o no de linfadenectomía axilar en el caso de micrometástasis sigue siendo una incógnita.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

New techniques in the study of the sentinel node: our experience of the one step nucleic acid amplification assay

Abstract

Objective: To describe the experience of our Breast Pathology Unit after implementation of the OSNA assay for the detection of axillary sentinel nodes in patients with breast carcinoma and to compare the data obtained with those obtained by the previously used method of routine histological analysis.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: NAGORE.CEBERIOGANZARAIN@osakidetza.net (N. Ceberio Ganzarain).

Material and methods: Two groups of women were retrospectively compared. One group included 148 patients diagnosed by using the OSNA assay and another group comprised 155 patients diagnosed by routine histology.

Results: The number of metastatic axillary nodes detected by OSNA was similar to that detected by the previously used routine histological method (36.1% using H&E and 36.5% by OSNA). The subjective feeling of an increased number of micrometastases detected by OSNA was excluded after retrospective study of the two groups (11.6% using H&E and 12.2% by OSNA).

Conclusion: The OSNA assay can be accepted as a sensitive, reliable and reproducible method for the intraoperative evaluation of sentinel nodes during surgical treatment of breast cancer. The need for axillary lymph node dissection in cases of micrometastases remains unclear.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El cáncer de mama es el tumor más prevalente en las mujeres, y puede llegar a afectar a una de cada 11 mujeres a lo largo de su vida. El estudio intraoperatorio del ganglio centinela (GC) se usa en la práctica habitual desde hace más de una década y su objetivo es realizar una cirugía mínimamente invasiva a nivel axilar dentro del tratamiento quirúrgico locorregional de la enfermedad.

Se denomina GC a la primera estación de drenaje de una región linfática que sería invadida por células tumorales, cuyo estado de afectación puede permitir suponer el estado del resto de los ganglios. Desde los años 90 se ha ido extendiendo su aplicación con el objetivo de minimizar la morbilidad creada por la linfadenectomía axilar. Con la técnica de extirpación GC se tiende a la cirugía mínima invasiva para el estudio patológico de la axila. Su valor clínico es que con una pequeña intervención es posible identificar, extirpar y con su estudio intraoperatorio determinar si existe metástasis regional o no.

La técnica de búsqueda del GC utiliza 2 tipos de marcadores: colorantes (desaconsejado su uso exclusivo) y sustancias coloides marcadas con un isótopo radioactivo (radiotrazadores), generalmente ^{99m}Tc , que se inyecta previamente a la cirugía. Mediante el uso de imágenes linfogammagráficas se puede obtener información del patrón dominante de drenaje y la presencia de drenajes únicos, múltiples o aberrantes. De forma intraoperatoria se realiza un rastreo con una sonda de radiación gamma portátil, que detecta un punto caliente con la emisión de una señal sonora que confirma la elección del sitio adecuado para la incisión quirúrgica que accede directamente en el punto de máxima intensidad de radioactividad. El trazador radioactivo también tiene una importante función para determinar cuándo se completa el procedimiento. Se denomina GC secundario a aquel que capta < 10% de la actividad máxima. La sonda colocada en la herida operatoria después de extirpar cada uno de los ganglios con máxima radioactividad determina si queda alguno más con intensidad de radioactividad, en caso contrario, la operación está completada. Los criterios para la realización de la biopsia selectiva del GC¹ se recogen en la [tabla 1](#).

A continuación se trata de explicar las 2 técnicas de estudio intraoperatorio del GC.

1. *Estudio anatomopatológico histológico de rutina:* se realiza mediante cortes por congelación y tinción

Tabla 1 Criterios de realización de la biopsia selectiva del ganglio centinela

Carcinoma T1 y T2, cuando la axila es clínica y ecográficamente negativa
CDIS extenso (> 4 cm) y alto grado y/o comedonecrosis en los que se vaya a realizar mastectomía
Tumor multifocal
Cáncer de mama en el varón con las mismas indicaciones
Si se va a tratamiento neoadyuvante y axila clínica y ecográficamente negativa, debe realizarse previo al tratamiento
Biopsias o cirugías previas mamarias no lo contraindican
Posible uso en gestación o lactancia (si se suspende 24 h antes)

hematoxilina-eosina. Ello implica realizar secciones a distintos niveles que permita detectar, por lo menos, metástasis de más de 2 mm. Si no se objetiva tumor intraoperatoriamente, se debe completar el estudio mediante secciones del tejido restante, al menos cada 200 micras, haciendo marcadores inmunohistoquímicos para detectar carcinoma oculto o micrometástasis si la técnica de HE es negativa.

2. *Técnica molecular One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA):* el sistema OSNA realiza en un solo tiempo el análisis completo del GC mediante la cuantificación de la expresión de ARNm de CK 19 por un método de amplificación isotérmica que consigue tiempos de amplificación de 16 min. El escaso tiempo requerido para el procedimiento, que oscila alrededor de 30 min, permite realizar un diagnóstico intraoperatorio de hasta 4 ganglios en paralelo, evitando la morbilidad y los costes de una segunda intervención. Por otra parte, el OSNA permite el estudio del ganglio linfático en su totalidad, evitando el «desperdicio» de tejido inherente incluso al procedimiento histológico más exhaustivo.

Probablemente, sin embargo, la gran ventaja del procedimiento consistirá en conseguir la imprescindible estandarización de resultados² altamente sensibles y específicos a fin de poder comparar grupos pronósticos realmente semejantes que no dependan del procedimiento de estudio ni del patólogo que lo interprete³. En resumen, el sistema OSNA es una técnica de alta sensibilidad, especificidad y

reproducibilidad diagnósticas en un tiempo limitado evitando reintervenciones innecesarias

Definiciones de GC positivo^{4,5}:

- Macrometástasis: ≥ 2 mm de diámetro de afectación en HE o ≥ 5.000 copias por técnica molecular.
- Micrometástasis: 0,2-2 mm de diámetro sobre laminilla o $\geq 250 < 5.000$ copias.
- Células tumorales aisladas: $< 0,2$ mm en laminilla o < 250 copias (AJCC 7.^a edición).

La actitud a seguir según los resultados del GC es la siguiente. Si se confirma metástasis se debe practicar la linfadenectomía axilar. Si el resultado es de micrometástasis implica igualmente linfadenectomía. Sin embargo, algunos autores empiezan a cuestionar la necesidad de realizar linfadenectomía en dichos casos⁶. La existencia de células tumorales aisladas no implica la realización de ningún acto añadido.

Por todo ello, este estudio pretende determinar las características de las pacientes con cáncer de mama de nuestro centro y analizar los resultados obtenidos con ambas técnicas.

Material y métodos

Se realizó un estudio descriptivo transversal retrospectivo entre enero de 2007 y diciembre de 2010 entre las pacientes operadas de un cáncer de mama en el Hospital de Txagorritu de Vitoria-Gasteiz (Álava).

Período de estudio

Durante la primera parte del estudio, de enero del 2007 a diciembre del 2008, a las 155 pacientes atendidas en nuestro centro se les realizó estudio del GC mediante técnicas anatomopatológicas clásicas. Durante la segunda parte del estudio, de enero de 2009 a diciembre de 2010, se operaron un total de 148 pacientes donde la técnica elegida fue el OSNA.

Participantes

Las participantes fueron todas aquellas sometidas a cirugía de cáncer de mama que cumplían criterios de inclusión para protocolo de GC.

Recogida de datos

La recogida de datos se realizó mediante la historia clínica electrónica (Clinic). Se recogieron datos sobre las características de las pacientes (edad, tipo de tumor, tamaño y grado histológico) y sobre la técnica y cirugía realizada (tipo de técnica, número de GC aislado durante la cirugía, afectación o no de estos y resultados anatomopatológicos de la linfadenectomía axilar).

Tabla 2 Distribución de los tumores estudiados

	Grupo		Total
	HE	OSNA	
CDIS	119 (76,8%)	113 (76,4%)	232 (76,6%)
CSI	18 (11,6%)	17 (11,5%)	35 (11,6%)
CLI	8 (5,2%)	9 (6,1%)	17 (5,6%)
Otros	10 (6,5%)	9 (6,1%)	19 (6,3%)
Total	155 (100%)	148 (100%)	303 (100%)

Análisis estadístico

Las características cuantitativas de las pacientes como la edad y el número de ganglios afectados, se expresan como media, desviación estándar, máximo y mínimo mientras que las categóricas; con frecuencias y porcentajes.

La comparación de las distintas variables entre las pacientes a las que se les realizó la técnica clásica con hematoxilina eosina y las pacientes a las que se realizó con OSNA se llevó a cabo mediante la prueba de Chi cuadrado en caso de las variables categóricas o con la prueba de T de Student en el caso de las variables continuas. El análisis estadístico se realizará mediante el programa IBM SPSS Statistics (v.18).

Resultados

Durante el estudio se intervinieron un total de 303 pacientes, de las cuales a 155 pacientes se les realizó la técnica clásica con hematoxilina eosina (51,2%) y a 148 (48,8%) con OSNA. La edad media de las pacientes intervenidas fue de $58,5 \pm 11,3$ (30-84), en el grupo de técnica clásica fue de $59,1 \pm 11,5$ y en OSNA $57,9 \pm 11$ sin que se detectaran diferencias estadísticamente significativas ($p=0,374$).

El 10,9% ($n=33$) del total de la muestra eran tumores intraductales, el 70,3% ($n=213$) eran T1, el 18,5% ($n=56$) T2 y 0,3% ($n=1$) eran mayores de 5 cm. En el grupo de HE 10,3% ($n=16$) eran in situ, 71% ($n=110$) T1, 18,1% ($n=28$) T2, y 0,6% ($n=1$) eran mayores de 5 cm. En el grupo OSNA 11,5% ($N=17$) eran in situ, 69,6% T1 ($n=103$), 18,9% T2 ($n=28$).

Respecto al tipo histológico del tumor (tabla 2) el 76,6% ($n=232$) eran CDI, 11,6% ($n=35$) CDIS, 5,6% ($n=17$) CLI, y 6,3% ($n=19$) otros tipos histológicos menos frecuentes. En el grupo HE el tumor más frecuente fue el CDI (76,8%; $n=119$) y CDIS (11,6%; $n=18$), y mientras que entre las mujeres a las que se les realizó OSNA la mayoría también presentaban CDI (76,4%; $n=113$) o CDIS (11,5%; $n=17$) sin que se detectaran diferencias estadísticamente significativas ($p=0,98$).

La media de ambos grupos en cuanto al número de GC axilares aislados fue de $2 \pm 0,9$ (0-6). En el grupo HE la media fue $1,8 \pm 0,9$ y en el OSNA $2,2 \pm 1$ siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

El GC se aisló exclusivamente en territorio axilar en el 87,7% ($n=136$) del grupo HE y 84,5% ($n=145$) del OSNA. En el resto se realizó extirpación del GC de la cadena mamaria interna con estudio diferido de su posible afectación.

La tabla 3 muestra el número de macrometástasis, micrometástasis y células tumorales aisladas definidas según los criterios TNM. En el grupo HE el 63,9% ($n=99$) de los pacientes no tuvo afectación del GC. En el 9,7% ($n=15$) se aislaron

Tabla 3 Clasificación de los tumores según la afectación

	Grupo		Total
	HE	OSNA	
Ninguno	99 (63,9%)	94 (63,5%)	193 (63,7%)
Células aisladas	15 (9,7%)	8 (5,4%)	23 (7,6%)
Micrometástasis	18 (11,6%)	18 (12,2%)	36 (11,9%)
Macroetástasis	23 (14,8%)	28 (18,9%)	51 (16,8%)
Total	155 (100%)	148 (100%)	303 (100%)

células tumorales aisladas, en el 11,6% (n = 18) se halló una micrometástasis y en el 14,8% (n = 23) una macrometástasis.

En el grupo OSNA, en el 63,5% (n = 94) el GC estaba libre de infiltración tumoral. El 5,4% (n = 8) tenía afectación por células tumorales aisladas, el 12,2% (n = 18) por micrometástasis, y el 18,9% (n = 28) por macrometástasis. No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p = 0,459).

Linfadenectomía

En el grupo HE no se realizó LDA en el 73,5% (n = 114) de las pacientes. En aquellas donde se realizó, el 0,6% (n = 1) no tuvo afectación axilar alguna, el 9,7% (n = 15) se aisló únicamente afectación por micrometástasis, en el 14,2% (n = 22) la afectación macrometastásica era de entre uno y 3 ganglios y en el 1,9% había afectación de más de 4 ganglios aislados.

En el grupo OSNA el 68,2% (n = 101) no requirió LDA, el 1,4% (n = 2) no se aisló tumor alguno en la LDA, 10,1% (n = 15) tenían micrometástasis, 16,9% (n = 25) afectación de 1-3 ganglios y 3,4% (n = 5) más de 4 ganglios positivos (tabla 4). Estudiando más específicamente el grupo de las pacientes con afectación por micrometástasis (tabla 5) observamos

que en ambos grupos eran 18 las pacientes con afectación con micrometástasis. En el grupo HE la mayoría (77,8%; n = 14) de las pacientes presentaban micrometástasis en algún ganglio y 3 pacientes (16,7%) tuvieron mayor (de uno a 3 ganglios) afectación. En el grupo OSNA el 83, 3% de las pacientes (n = 15) se detectaron micrometástasis en algún ganglio, en un caso (n = 5,6%) no se realizó LDA y en 2 del resto había más afectación que la de la micrometástasis (11,1%). No se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos (p = 0,565).

Discusión

El método OSNA ha supuesto un importante avance debido a la alta sensibilidad, que elimina la variabilidad interobservador y errores de muestreo de la técnica histopatológica convencional. Esto ha permitido la estandarización de la afectación del GC entre los distintos hospitales, logrando mejorar el registro de estos tumores².

Esta técnica no esta exenta de desventajas, ya que el tiempo de estudio intraoperatorio se alarga entre 10-15 min respecto a la HE por lo que es necesario optimizar los circuitos de quirófano-anatomía patológica para intentar minimizar esta espera. Hay grupos que con la práctica han conseguido un tiempo de 30-35 min desde la extirpación hasta su diagnóstico, que también dependerá del número de ganglios aislados. Se debe considerar globalmente, teniendo en cuenta el tiempo ahorrado en segundas intervenciones y en el retraso del inicio de la quimioterapia.

La implantación de esta técnica supone una inversión importante para los hospitales y el servicio por su precio elevado, pero está justificado por su alta eficiencia que se basa en la disminución de ingresos y reintervenciones posteriores.

Basándonos en el mecanismo de acción del OSNA, cabe destacar la necesidad de obtener la CK19 en la biopsia

Tabla 4 Resultados de la linfadenectomía según ambas técnicas

	Grupo		Total
	HE	OSNA	
Sin afectación de ningún ganglio aislado	1 (0,6%)	2 (1,4%)	3 (1,0%)
Hay micrometástasis en algún ganglio aislado (incluyendo el GC)	15 (9,7%)	15 (10,1%)	30 (9,9%)
Afectación de 1-3 ganglios axilares	22 (14,2%)	25 (16,9%)	47 (15,5%)
Más de 4 ganglios aislados tienen metástasis por tumor	3 (1,9%)	5 (3,4%)	8 (2,6%)
No se realizó linfadenectomía axilar	114 (73,5%)	101 (68,2%)	215 (71,0%)
Total	155 (100%)	148 (100%)	303 (100%)

Tabla 5 Resultados tras la linfadenectomía en los casos de afectación micrometastásica

	Grupo		Total
	HE	OSNA	
Micrometástasis en algún ganglio aislado (incluyendo el GC)	14 (77,8%)	15 (83,3%)	29 (80,6%)
Afectación de 1-3 ganglios axilares	3 (16,7%)	1 (5,6%)	4 (11,1%)
Más de 4 ganglios aislados tienen metástasis por tumor	0 (0%)	1 (5,6%)	1 (2,8%)
No se realiza linfadenectomía axilar	0 (0%)	1 (5,6%)	1 (2,8%)
Total	18 (100%)	18 (100%)	36 (100%)

prequirúrgica para saber si será posible la realización de este método^{7,8}. Hasta la fecha, desde el inicio de obtener CK en la biopsia previa se han realizado 122 casos OSNA, y tan solo en 3 la CK ha sido negativa (2,45%), en los que se ha realizado técnica HE. Se considera que el porcentaje de carcinomas de mama con CK 19 negativo es de 3,5% el los de fenotipo luminal y 6% en los del fenotipo basal⁹.

Algunos detractores del método plantean la duda ante el hecho de que el factor pronóstico de la ruptura capsular del GC por la metástasis tumoral es ahora invalorable. El estudio diferido de la grasa pericapsular por el anatomopatólogo y la cuantificación exacta que se obtiene con el OSNA de su afectación suplen este defecto.

En nuestra muestra los resultados obtenidos en cuanto afectación del GC son parecidos utilizando ambas técnicas, igual que han demostrado varios autores¹⁰⁻¹⁶.

La sensación de aumento de diagnóstico de micrometástasis con OSNA se palpa en el ambiente de quirófano. En nuestros resultados se observa que se trata de un tema subjetivo, tal vez justificado por el no descubrimiento de algunas micrometástasis en el primer acto quirúrgico mediante la técnica anatomopatológica de rutina.

Desde su descripción a finales del 2008, ya son 64 los hospitales que lo han implantado hoy en España, lo que significa que su difusión es una realidad. El reto actual ya no es demostrar la concordancia de las 2 técnicas diagnósticas, sino el valor pronóstico y predictivo de los resultados^{17,18}. Existe ahora mismo una controversia importante en el mundo científico, debido a que se está cuestionando la necesidad de realizar la LDA en pacientes con afectación micrometastásica¹⁹⁻²¹. Se debe estudiar si la realización de una linfadenectomía está justificada poniendo en una balanza sus riesgos y beneficios. En nuestra muestra se ha visto que la afectación por micrometástasis es un número reducido, pero la mayoría de ellas (78% en el grupo HE y 83% de OSNA) no tenían mayor afectación que esta. Aunque los últimos consensos aún recomiendan la LDA como «*gold standard*» para su tratamiento, ya hay estudios en marcha para ver su implicación en el intervalo libre de enfermedad y supervivencia global. Por ello, la investigación de nuevos tratamientos sistémicos puede ser clave a la hora de nuevas decisiones.

Conclusión

En menos de 3 años de su descubrimiento, el método OSNA se presenta como un método seguro, sensible y reproducible para el estudio del GC. Su implantación y difusión permitirá la estandarización de sus resultados. La controversia actual se centra en la necesidad o no de realización de linfadenectomía axilar en aquellos casos de afectación por micrometástasis.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. Actualización del consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. *Cir Esp*. 2007;82:146-9.
- Laia BV, Marcos MB, Refael CM, Francisco SC, Jose T, Blai BS, et al. Molecular diagnosis of sentinel lymph nodes for breast cancer: one step ahead for standardization. *Diagn Mol Pathol*. 2011;20:18-21.
- Turner RR, Weaver DL, Cserni G, Lester SC, Hirsch K, Elashoff DA, et al. Nodal stage classification for breast carcinoma: improving interobserver reproducibility through standardized histologic criteria and image-based training. *J Clin Oncol*. 2008;26:258-63.
- Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:1471-4.
- Boffa DJ, Greene FL. Reacting to changes in staging designations in the 7th edition of the AJCC staging manual. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:1-3.
- Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2011;305:569-75.
- Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Duflath R, Gomes M, Zeferino LC, et al. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 2011;64:493-7.
- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol*. 2004;203:661-71.
- Perou CM, Sørbye T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-52.
- Bernet L, Cano R, Martínez M, Dueñas B, Matias-Guiu X, Morell L, et al. Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study. *Histopathology*. 2011;58:863-9.
- Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A, et al. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: A comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer*. 2011, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.26060>.
- Khaddage A, Berremila SA, Forest F, Clemenson A, Bouteille C, Seffert P, et al. Implementation of molecular intra-operative assessment of sentinel lymph node in breast cancer. *Anticancer Res*. 2011;31:585-90.
- Guillén-Paredes MP, Carrasco-González L, Chávez-Benito A, Aguayo-Albasini JL Application of the OSNA technique for intra-operative analysis of sentinel lymph node in breast cancer. *Cir Esp*. 2011;89:261-2.
- Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, Gittleman M, Beitsch PD, Young PR, et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer*. 2011, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25822>.
- Snook KL, Layer GT, Jackson PA, de Vries CS, Shousha S, Sinnott HD, et al. Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg*. 2010, <http://dx.doi.org/10.1002/bjs.7347>.
- Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res*. 2009;15:2879-84.
- Kumar S, Bramlage M, Jacks LM, Goldberg JI, Patil SM, Giri DD, et al. Minimal disease in the sentinel lymph node: how to best measure sentinel node micrometastases to predict risk of additional non-sentinel lymph node disease. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:2909-19.
- Kahn HJ, Hanna WM, Chapman JA, Trudeau ME, Lickley HL, Mobbs BG, et al. Biological significance of occult

- micrometastases in histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer patients using the recent American Joint Committee on Cancer breast cancer staging system. *Breast J.* 2006;12:294–301.
19. Jakub JW, Bryant K, Huebner M, Hoskin T, Boughey JC, Reynolds C, et al. The number of axillary lymph nodes involved with metastatic breast cancer does not affect outcome as long as all disease is confined to the sentinel lymph nodes. *Ann Surg Oncol.* 2011;18:86–93.
 20. De Boer M, Van Dijck JA, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VC. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:410–25.
 21. Van Deurzen CH, De Boer M, Monnikhof EM, Bult P, Van der Wall E, Tjan-Heijnen VC, et al. Non-sentinel lymph node metastases associated with isolated breast cancer cells in the sentinel node. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:1574–80.