

**Andrología**

## **Varicocele: fisiopatología y actualización diagnóstica desde el laboratorio**

### *Varicocele: fisiopathology and update diagnostic from the laboratory*

Sánchez M, César M, Farré R, Magaña P, Aulesa C.

Área de Andrología del Laboratorio Clínico. Hospital de la Vall d'Hebron. Barcelona.

#### **Resumen**

**Introducción:** *El varicocele es la causa más importante de esterilidad masculina. A menudo el varicocele de grado 1 ó 2 es diagnosticado a través del análisis del Seminograma de pacientes procedentes de la consulta de Infertilidad.*

**Objetivo:** *La puesta a punto de dos test de laboratorio sencillos de efectuar y que orienten a ser posible al diagnóstico de varicocele en un Seminograma patológico.*

**Diseño:** *Nuestra Unidad de Seminología recibe el 75% de peticiones de Seminograma proveniente de la consulta de Infertilidad del área Maternal. Se han realizado dos sencillos tests de laboratorio, test de Azul de Anilina (AB: Anilin Blue) y test del Naranja de acridina (AO: Acridin Orange), en un muestra de 84 sémenes, normales y patológicos, analizando posteriormente sus resultados y contrastándolos con las historias clínicas.*

**Resultados:** *El análisis estadístico de los resultados, aplicando las denominadas curvas ROC, muestra que el test de azul de Anilina junto con la concentración de espermatozoides, son los dos parámetros que presentan una mayor fiabilidad para orientar el diagnóstico de varicocele en muestras provenientes de consulta de Infertilidad.*

**Conclusiones:** *Se pone en rutina la realización de un test sencillo de laboratorio, el azul de anilina como ayuda diagnóstica del varicocele y se actualiza la importancia del recuento de espermatozoides, en el contexto del Seminograma.*

**Palabras clave:** Varicocele, Test de azul de anilina (AB: Anilin Blue). Test de naranja de acridina (AO: Acridin Orange). Seminograma.

#### **Summary**

**Introduction:** *Varicocele is the main cause of sterility in men. One or two degree's varicocele is often diagnosed by semen analysis derived from Infertility Department.*

**Aim:** *The aim of this study is to perform two laboratory test, easy to carry out and which help with the diagnosis of the varicocele in a pathological semen sample.*

---

**Correspondencia:** Dr. Marcelino Sánchez, Carlos Aulesa.  
Area de Andrología del Laboratorio Clínico. Hospital de la Vall d'Hebron. Barcelona.  
Paseo de la Vall d'Hebron, 119-129. Barcelona 08035.  
e-mail: caulesa@vhebron.net

*Design: The seventy five percent of semen samples received in our Andrology-laboratory Area come from Infertility Department ( Maternity Area). Two easy analytical test have been performed and updated: Aniline Blue(AB) and Acridine Orange(AO) staining test. 84 samples were analysed (control and pathological) by the study of the Semen analysis and subsequently the results were contrasted with the clinical histories.*

*Results: Statistical test made by Roc curves, shows that the Aniline Blue staining test(AB) and the sperm concentration, have a greater fiability to help the diagnosis of the varicocele in semen samples from Infertility Department.*

*Conclusions: We have updated a laboratory test, the Aniline Blue staining, that is included to the routine in the semen analysis, to help to the diagnosis of varicocele. Moreover, we have reviewed the importance of the sperm concentration into the sSemen analysis.*

**Key words:** Varicocele. Aniline Blue staining test. Acridine Orange test. Spermogram

## INTRODUCCIÓN

El varicocele es la dilatación varicosa de las venas espermáticas y el plexo pampiniforme por incompetencia valvular venosa y aumento de la presión intra-vascular con un reflujo retrógrado espermático. Está considerado como el factor más frecuente relacionado con la infertilidad masculina (1-3). La incidencia en la población masculina general es aproximadamente del 15% (4).

Diferentes teorías explican el mecanismo de esterilidad en el varicocele:

1. Insuficiencia del eje hipotálamo-hipofisario-testículo.
2. Temperatura escrotal: En el varicocele hay una elevación de la temperatura escrotal que provoca una disminución de la espermatogénesis.
3. Reflujo de metabolitos suprarrenales.
4. Hipertensión venosa e hipoxia gonadal (5-7)

Se distinguen tres tipos de varicocele: Espermático, Cremastérico o mixto. En el 68% de los casos el varicocele es espermático, afectando a la vena espermática interna y al plexo anterior. Es más frecuente en el lado izquierdo (80-93%), debido a la mayor longitud de la vena espermática izquierda y su anatomía desembocando en la vena renal izquierda con válvulas incompetentes (8-10).

Se han descrito tres tipos de alteraciones en el estudio hemodinámico del varicocele:

- Tipo 1: Reflujo venoso de la espermática y comunicantes.
- Tipo 2: Obstrucción de la vena ilíaca común izquierda con retorno venoso por la espermática normal.
- Tipo 3: Engloba a los dos anteriores.

En el teste con varicocele inciden diversas circunstancias en lesionar la línea germinal: temperatura, metabolitos tóxicos, factores enzimáticos y hormonales, hipoxia, alteraciones epididimarias e hipertensión.

Los cambios histopatológicos que se van a producir en el teste pueden ser: cambios ultraestructurales en las células de Sertoli, detención incompleta de la maduración de espermátides y espermatocitos, engrosamiento tubular con disminución del diámetro y fibrosis de los túbulos, alteración en las células de Leydig y alteraciones en el testículo contralateral (11)

El diagnóstico principalmente del tipo 1 es a veces controvertido y su relación con el seminograma sigue siendo un enigma. La valoración del paciente con varicocele debe implicar una historia clínica exhaustiva incluyendo antecedentes reproductivos, una exploración testicular y examen físico y exploraciones complementarias tipo ecografías, termografía y análisis hormonales y con un mínimo de dos Seminogramas.

En el análisis del semen podemos encontrar: oligospermia, astenospermia, teratospermia, incremento de formas inmaduras y otras alteraciones.

Como ayuda diagnóstica del varicocele, en este estudio proponemos dos tests de laboratorio adicionales: El Test de Naranja de Acridina que halla, mediante recuento manual previa tinción con naranja de acridina, el porcentaje de formas que presentan fragmentación del ADN mediante la ayuda de un microscopio fluorescente. El segundo test propuesto es el Test de Azul de Anilina que se utiliza para apreciar el grado de maduración nuclear de los espermatozoides y se determina con ayuda de un microscopio óptico y la tinción previa de la muestra con azul de anilina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes:

Se realizó un estudio transversal de 84 Seminogramas, siguiendo la normativa de recogida que indica la OMS (12), de los cuales 41 procedían de consultas externas de Infertilidad, 42 pacientes de

la consulta de Urología, de los que 30 presentaban el diagnóstico de varicocele.

#### **Métodos:**

**Tinción de Naranja de Acridina:** Se fundamenta en la fluorescencia verde que produce el fluorocromo naranja de acridina cuando se une al ADN de doble cadena y normal y fluorescencia roja cuando se une a ADN desnaturalizado (cadena sencilla). Se realiza mediante recuento manual del porcentaje de formas que presentan ADN fragmentado. El estado del ADN del espermatozoide es un indicador de potencial de fertilidad.

La técnica puede realizarse con semen fresco o muestra procedente de un swim-up y se ha efectuado una adaptación propia del método de Tejada R et al. y modificaciones posteriores (13-16).

Se extienden 10 microlitros de semen en un porta y se fija con etanol al 96 % durante 20 minutos. La tinción de naranja de acridina se prepara en tampón cítrico-fosfato a pH 3,5 (13). Se tiñe durante 5 minutos y se lava en agua destilada. Una vez seco, se procede a la lectura en microscopio de fluorescencia. Este recuento valora el porcentaje de fragmentación del ADN, a 200 elementos.

Se ha efectuado una evaluación del método de laboratorio y ha presentado una imprecisión media intradía de 15,81% con un rango entre 4,6 y 22,4%. Dado la carencia de controles no se ha podido evaluar la inexactitud, pero se han realizado a lo largo del estudio diversas extensiones de un pool de sémenes y procesado como control interno del proceso de tinción, paralelamente a las muestras procesadas. El valor de referencia del método se ha establecido en una muestra de 39 sémenes normales, encontrándose una media de 8,5% con un intervalo de confianza del 95% de 7-12%, así valores superiores al 12% se consideran patológicos.

**Tinción de Azul de Anilina:** En mamíferos el empaquetamiento del ADN durante la transformación de espermátides a espermatozoides implica la sustitución de proteínas tipo histonas por proteínas básicas ricas en arginina y cistina, denominadas protaminas. Durante el paso a través del epidídimo se forman puentes disulfuro entre las protaminas y residuos de cisteína, asegurando una condensación estable del complejo de nucleoproteína. Asimismo, el Zinc estabiliza la condensación nuclear del espermatozoide, intercalándose entre grupos amino libres de la arginina y grupos tiol libres de la cisteína. Cuando el espermatozoide penetra en el ovocito, se produce la descondensación de la cromatina nuclear y se desintegran

las membranas de la cabeza, se pierde el Zinc nuclear y se rompen los enlaces disulfuro entre proteínas. Alteraciones de la condensación de la cromatina pueden estar ligadas a una persistencia de las proteínas histonas y por tanto, un aumento de formas inmaduras que causaría infertilidad. El Azul de Anilina se une específicamente a residuos de lisina de las histonas.

La técnica de laboratorio puede realizarse con semen fresco o muestra procedente de un swim-up. Se ha efectuado una adaptación propia del método de Terquem A. et al. y modificaciones posteriores (17-19).

Se extienden 10 microlitros de semen en un porta y se fija con etanol al 96 % durante 20 minutos. La tinción de naranja de acridina se prepara en tampón cítrico-fosfato a pH 2,5 (19). Se tiñe durante 1 minuto y se lava en agua destilada. Una vez seco, se procede a la lectura en microscopio óptico con objetivo de inmersión, evaluando el porcentaje de formas inmaduras a 200 elementos.

Se ha efectuado una evaluación del método de laboratorio y ha presentado una imprecisión media intradía de 17% con un rango entre 6-26%. Dado la carencia de controles no se ha podido evaluar la inexactitud, pero se han realizado a lo largo del estudio diversas extensiones de un pool de sémenes y procesado como control interno del proceso de tinción, paralelamente a las muestras procesadas. El valor de referencia se ha establecido con una muestra de 39 sémenes normales y se ha encontrado un valor medio de 12% con un intervalo de confianza del 95% de 9-18%, valores superiores al 18% se consideran patológicos.

**Seminograma:** Se ha realizado siguiendo la normativa de la OMS y de la ESHRE. Efectuando el conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer Improvado por duplicado y contando 200 espermatozoides; la motilidad, manualmente según la OMS a 37°C, también a 200 espermatozoides y el análisis de la vitalidad con el método recomendado por la OMS de Eosina-Nigrosina. Finalmente el estudio de la morfología, siguiendo el criterio de Kruger (VN>15%) (20), se ha realizado con la ayuda del método rápido de tinción Diff Quick (Allegiance Healthcare Corp, McGraw Park, IL) a 200 espermatozoides.

## **RESULTADOS**

En una muestra de 83 pacientes a los que se les solicitaba el Seminograma se han realizado los tests de Azul de anilina (AB: Anilin Blue) y Naranja de acridina (AO: Acridin Orange). Del total de muestras, 41 procedían de la Consulta externa de Fertilidad del Área Maternal y 42 de la Consulta externa de

Urología del Hospital General, de los que 30 habían sido diagnosticados de varicocele en sus diversos estadíos.

De las 83 muestras analizadas, 41 presentaban un seminograma que según los criterios de la OMS 2000 (12) y el de Kruger (20) para la morfología (VN>15%), se podían clasificar como normales. El otro grupo de 42 pacientes presentaban alteraciones en alguno o varios de los parámetros del Seminograma.

En la Tabla 1 se muestran las medias de los parámetros citológicos del Seminograma y de los dos tests de Azul de anilina y Naranja de acridina por procedencias, normales y anormales y con diagnóstico de varicocele.

Queremos establecer cuál es el parámetro que mejor nos puede ayudar en el diagnóstico de varicocele, ya que según la bibliografía consultada es dispar al respecto. Algunos autores señalan la aparición de espermatozoides alargados (tapering), como característica diagnóstica del varicocele. Mientras, otros autores plantean como diagnóstico del varicocele la aparición de células germinales, el recuento de espermatozoides disminuido, etc (7-9).

Hemos estudiado un grupo de 30 varicoceles perfectamente diagnosticados y se ha hallado de cada parámetro del Seminograma y de los nuevos tests, la sensibilidad, especificidad y calculado las curvas ROC y el área bajo la curva (AUC).

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos y su representación gráfica (Fig. 1) considerando co-

mo patológico el parámetro que sobrepase el valor normal establecido por la OMS y Kruger y en los tests de Azul de anilina valores superiores al 18% y en el test de Naranja de acridina valores superiores al 12%.

Para el análisis de estos resultados estadísticos seguiremos las indicaciones que nos muestran varios autores para su interpretación. Swets et al (21) y otros autores (22-25), interpretan que unos valores de Area bajo la curva (AUC) entre 0,5 y 0,7 indican una baja utilidad diagnóstica, valores de AUC entre 0,7 y 0,9, pueden ser de utilidad diagnóstica y valores superiores a 0,9 indican una gran exactitud clínica y fiabilidad diagnóstica del test. Este criterio permite además la estimación del intervalo de confianza del 95% (IC) del AUC que según estos autores, si el IC de la AUC incluye el valor 0,5, el test no es capaz de distinguir entre normal y anormal, en cambio valores del IC superiores y que no engloban el valor 0,5 indican su posible utilidad diagnóstica. Según indican otros autores, el mejor criterio cuando se quiere comparar varios tests diagnósticos, es el que presenta el área más grande bajo la curva (mayor AUC). Es posible también estudiar la diferencia significativa entre dos AUCs por la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (23-25).

El análisis de los resultados preliminares de la Tabla 2, aplicando los criterios expuestos, indican que en el grupo de los varicoceles, de todos los parámetros estudiados los que presentan mayor fiabilidad

**Tabla 1**

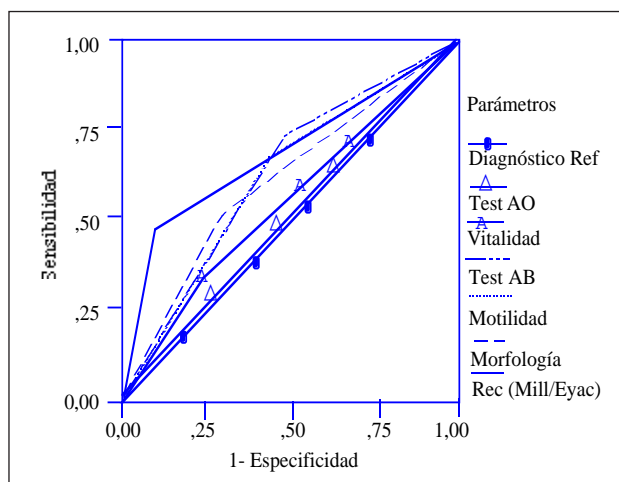
Medias y desviación estándar de los parámetros del Seminograma y los tests de AO y AB por procedencia, normalidad y grupo patológico de los varicoceles.

(Rec/eya: Recuento de espermatozoides por eyaculado; Mot: Clasificación de la Motilidad espermática; Vit: Vitalidad; Mor Nor: Recuento de Espermatozoides con morfología normal; AO: Tinción de Naranja de Acridina; AB: Tinción de Azul de Anilina)

	N	Vol(ml) (sd)	pH (sd)	Rec/eya (sd)	Mot(a+b) (sd)	Mot(c+d) (sd)	% vit (sd)	% mor Nor(sd)	%AO (sd)	%AB (sd)
Fertilidad	41	3,68 (3.7)	7,57 (0.33)	233 (265)	47 (21.04)	53 (21.25)	59 (14.09)	24 (11.26)	15 (10.6)	20 (9.10)
Urología	42	3,02 (1.75)	7,59 (0.29)	117 (141)	42 (19)	58 (18.9)	56 (17.1)	19 (15.02)	13 (10.25)	25 (14.65)
Normal	41	3,77 (1.88)	7,55 (0.33)	258 (263)	58 (13.4)	42 (13.85)	66 (10.4)	29 (13.4)	11 (6.65)	20 (8.75)
Anormal	42	2,93 (1.72)	7,61 (0.3)	88 (108)	31 (15.9)	69 (15.9)	49 (15.3)	14 (8.9)	17 (12.2)	25 (2.3)
Varicocele	30	2,85 (1.73)	7,6 (0.3)	115 (142)	42 (18.8)	58 (18.69)	54 (17.6)	19 (13.5)	14 (10.8)	27 (15.5)

**Tabla 2***Valor diagnóstico de cada test en el varicocele. (\*parámetro estadísticamente significativo)*

	Sensibilidad %	Especificidad %	AUC	IC del 95%
Rec Mill/eyaculado	48.3	10.6	0.688	0.558 - 0.818
Motilidad(a+b)(%)OMS	69.0	46.8	0.611	0.481 - 0.741
Vitalidad (%)	37.9	27.7	0.551	0.416 - 0.686
Morfología Normal (%)	51.7	31.9	0.599	0.466 - 0.732
AO (Acridin-Orange) (%)	51.7	44.7	0.535	0.401 - 0.669
AB (Anilin-Blue) (%)	75.9	53.2	0.613	0.501 - 0.742

**Figura 1***Curvas ROC parámetros seminograma, test AO y AB*

diagnóstica por tener una mayor AUC y con un IC que no engloba el valor 0,5, son el Recuento de espermatozoides por eyaculado con una AUC de 0,688 e IC del 95% de 0,558-0,818 y los resultados de Azul de anilina que presentan una AUC de 0,613 e IC del 95% de 0,510-0,742.

Establecidos los parámetros más adecuados para el diagnóstico de varicocele, la segunda parte de este trabajo ha sido un análisis estadístico comparativo de este grupo de varicoceles con una muestra de 41 pacientes con seminograma normal y en especial de los nuevos test actualizados de azul de anilina y naranja de acridina. Para efectuar este análisis estadístico se ha aplicado la prueba de t de Student a las medias de todos los parámetros entre el grupo de pacientes con Seminogramas normal y el del varicocele. Este análisis ha mostrado que sólo existen diferencias significativas en las medias de los parámetros del test de azul de anilina con una  $t = -2,344$  y una  $p = 0,022$  y en el conteo de espermatozoides por eyaculado con una  $t = 2,383$  y una  $p = 0,020$ . Con respecto al nuevo test de AO no parece ser adecuado para el diagnóstico del

varicocele, ya que no presenta diferencias significativas respecto al grupo normal.

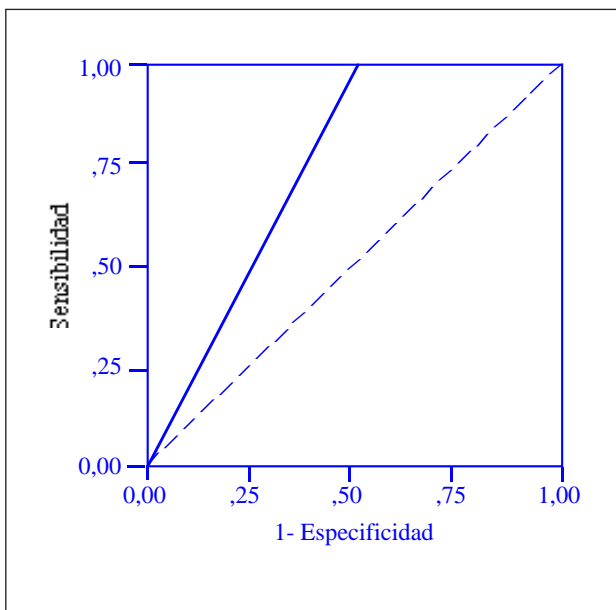
Se ha realizado un estudio retrospectivo de las historias clínicas de fertilidad y hemos encontrado que de los 41 pacientes estudiados, en tres de ellos se diagnosticó con posterioridad un varicocele, estando en dos de estos pacientes, alterado como novedad, el test de azul de anilina. Calculando la sensibilidad, se obtiene un valor de 47,2% y una especificidad de 52,8% y calculando la curva ROC (Fig. 2), nos muestra una AUC de 0,736 y un IC del 95% de 0,528-0,944.

## CONCLUSIONES

El varicocele es la causa clínica de mayor incidencia de la infertilidad masculina. Su diagnóstico es mayoritariamente clínico, siendo la historia y la exploración testicular los máximos exponentes. Sin embargo, la incidencia cada vez mayor de varicoceles no diagnosticados, ya sea por su estadio o por su poca expresividad clínica, en nuestras consultas de Fertilidad, ha motivado la realización de este trabajo de revisión de la utilidad diagnóstica de los parámetros del Seminograma y la puesta en marcha y actualización de dos tests: el azul de anilina (AB, anilin blue) y el test de acridina (AO, acridin orange). Dos pruebas económicas y de fácil realización, ya que consisten en dos tinciones del frotis del semen con los colorantes descritos y lectura posterior en microscopio óptico y fluorescente.

El estudio técnico de laboratorio de la actualización de estos tests, nos ha mostrado para el AB unos coeficientes de variación entre 6 y 24%, estableciendo el valor de referencia con una muestra de 41 sémenes normales entre 9 y 18%, valores superiores al 18% se consideran patológicos. Respecto al test de AO, muestra unos coeficientes de variación entre 5 y 22% estableciendo el Valor de referencia con una muestra de 41 sémenes normales entre 7 y 12%, valores superiores al 12% se consideran patológicos.





**Figura 2**  
Curva ROC Test de Azul de Anilina.

En un grupo de 30 varicoceles perfectamente diagnosticados se ha estudiado, aplicando métodos estadísticos avanzados como las curvas ROC y AUC con su IC del 95%, la fiabilidad diagnóstica de los parámetros del Seminograma y de los dos nuevos test. Se ha comprobado que el recuento de espermatozoides presenta una AUC de 0,688 e IC del 95% de 0,558-0,818 y los resultados del test de Azul de anilina presentan una AUC de 0,613 e IC del 95% de 0,510-0,742, se podrían considerar los dos tests de mayor fiabilidad diagnóstica del varicocele, mientras que los resultados del nuevo test AO, no son estadísticamente significativos ni aportan una mayor sensibilidad diagnóstica, en comparación con los demás parámetros del seminograma.

La positividad del test de Azul de anilina en los varicoceles, parece estar relacionado fisiopatológicamente con la alteración en el recambio de protaminas y histonas que se produce en el epidídimo, y que propicia la correcta compactación del DNA en el proceso de maduración de los espermatozoides. En estos pacientes diagnosticados de varicocele podría verse afectada la maduración y producir la positividad del test de Azul de anilina como indican algunos autores (26, 27).

El estudio estadístico comparativo mediante la t de Student de los parámetros que mejor parecen ayudar en el diagnóstico del varicocele, se ha realizado con 42 pacientes que presentaban un Seminograma normal y en los que también se realizaron los dos

nuevos tests. Este análisis ha mostrado también, que sólo existen diferencias significativas en las medias de los parámetros del test de azul de anilina y el conteo de espermatozoides por eyaculado. Con respecto al nuevo test de AO no parece tampoco ser adecuado para el diagnóstico del varicocele, ya que no presenta diferencias significativas respecto al grupo normal. Luego estos resultados nos indican que los varicoceles se podrían diferenciar y detectar de los pacientes normales, cuando el recuento presente valores anormales y los resultados del test de azul de anilina sean superiores al 18%. Luego estos resultados nos indican que los varicoceles se podrían diferenciar y detectar de los pacientes normales, cuando presenten valores anormalmente bajos en el recuento de espermatozoides y el resultado del test de azul de anilina sea superior al 18% de formas inmaduras. Finalmente queda demostrado que el test de azul de anilina y el recuento de espermatozoides, son los parámetros más fiables para detectar el varicocele.

La fase final del trabajo ha consistido en la revisión de las 41 historias clínicas de la consulta de Fertilidad, en tres de estos pacientes fue diagnosticada con posterioridad la presencia de un varicocele, estando en dos de ellos, alterados el recuento y el test de azul de anilina.

A la vista de estos resultados estadísticos y con los criterios expuestos, creemos que queda demostrada la utilidad clínica del test en el diagnóstico del varicocele en una población de pacientes de consultas externas de Fertilidad.

Por todo lo expuesto propugnamos la realización del test de Azul de anilina, un test económico y de fácil realización, ya que solo requiere la extensión de un frotis y su posterior tinción con el colorante y posterior lectura al microscopio óptico, a todos los pacientes de Fertilidad que presenten un Seminograma anormal, en especial el parámetro de recuento de espermatozoides, como ayuda diagnóstica del varicocele, la causa más común de infertilidad masculina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Dubin L, Amelar RD.:** Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril.* 1971; 22(8):469-74.
2. **Pomerol JM.:** Varicocele e Infertilidad. En: Remohí J, Pellicer A, Simon C. *Reproducción Humana*, 2ª ed. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.p.303-308
3. **Witt MA, Lipshultz LI.:** Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology.* 1993; 42 (5): 541-3.
4. **Chan PT, Goldstein M.:** Medical background on

- varicocele. *Drugs Today (Barc)*. 2002;38(1):59-67. Review.
5. **Jarow JP, Coburn M, Signan M.**: Incidence of varicoceles in men with primary and secondary infertility. *Urology*. 1996; 47 (1): 73-6.
  6. **American Urological Association and the practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.**: Report on varicocele and Infertility. *Fertil Steril* 2004; 82:142-145.
  7. **Aldave Villanueva J.**: Criptorquidia y varicocele, puesta al día. IV Curso de actualización andrológica 1994, Ed Ipar.sl, Pamplona.
  8. **Pomerol JM, Arrondo JL.**: Práctica Andrológica. Barcelona: Ed Mason-Salvat; 1994.
  9. **Campbell.**: Urología. Buenos Aires: Ed. Panamericana;1990.
  10. **Schoor RA, Elhanbly SM, Niederberger C.**: The pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *Curr Urol Rep*. 2001; 2 (6): 432-6.
  11. **Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K, Kamidono S.**: Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl*. 1989; 22 (2): 149-59.
  12. **OMS "Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical".**: Ed. Panamericana. 2000.
  13. **Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S.**: A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 1984; 42 (1): 87-91.
  14. **Claassens OE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, Kruger TF.**: The Acridine Orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod*. 1992; 7 (2): 242-7.
  15. **Roux C, Dadoune JP.**: Use of the Acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment: Evaluation of the chromatin condensation. *Andrologia*. 1989; 21 (3): 275-80.
  16. **Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF.**: Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*. 2004; 81 (4):965-72.
  17. **Terquem A, Dadoune JP.**: Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin: Evaluation of nuclear maturation. In: *The Sperm cell*. Ed Andre J. London. Martinus Nijhoff Publishers, 249-252.
  18. **Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML.**: Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*. 1988; 20 (3): 211-7.
  19. **Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP.**: Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl*. 1990; 13 (6): 452-62.
  20. **Kruger TF, Coetzee K.**: The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999; 5 (2):172-8.
  21. **Swets JA, Pickett RM.**: Evaluation of diagnostic systems: Methods from signal detection theory. New York. Academic press. 1982: 253
  22. **Burgueño MJ, García Bastos JL, González Buitrago JM.**: Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med Clin (Barc)*. 1995; 104 (17): 661-70.
  23. **Hallan S, Asberg A.**: The accuracy of C-reactive protein in diagnosing acute appendicitis: a meta-analysis. *Scand J Clin Lab Invest*. 1997; 57 (5): 373-80.
  24. **Beck JR, Shultz EK.**: The use of relative operating characteristic (ROC) curves in test performance evaluation. *Arch Pathol Lab Med*. 1986; 110 (1):13-20.
  25. **Aulesa C, Pastor I, Naranjo D, Galimany R.**: Application of receiver operating characteristics curve (ROC) analysis when definitive and suspect morphologic flags appear in the new Coulter LH 750 analyzer. *Lab Hematol*. 2004; 10 (1): 14-23.
  26. **Foresta C, Zorzi M, Rosatto M, Varotto A.**: Sperm nuclear instability and staining with aniline blue abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl*. 1992; 15 (4): 330-7.
  27. **Roux C, Le Lannic G, Dadoune JP.**: Étude quantitative de la composition en nucleoprotéines basiques d'éjaculats humains. Comparaison des données de la coloration nucléaire au bleu d'aniline. *Contracept-Fertil Sex* 1989; (17): 7-8: 645-64.