

کاربرد سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم (CASA) در سگ

محمد سروش انتظاری^۱، وحید حامدیان اصل^۲، پژمان میرشکرایی^{۳*}

۱. دانش‌آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۲. دانشجوی دکترای تخصصی فیزیولوژی دامپزشکی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.

دریافت: ۶ مردادماه ۱۴۰۵ پذیرش: ۲۱ شهریورماه ۱۴۰۵

چکیده

ارزیابی دقیق باروری سگ نر برای تعیین صلاحیت تولیدمثلی، انتخاب حیوان مولد، تشخیص اختلالات باروری، برنامه‌ریزی تلقیح مصنوعی اهمیت اساسی دارد. ارزیابی میکروسکوپی تحرک اسپرم، باوجود سادگی و کاربرد گسترده، تحت‌تأثیر تجربه ارزیاب، کیفیت میکروسکوپ و شرایط نمونه قرار می‌گیرد و توان محدودی در توصیف کمی سرعت و الگوی مسیر حرکتی هر اسپرم دارد. سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم (CASA) با شناسایی سر اسپرم در فریم‌های متوالی و بازسازی مسیر حرکت آن، پارامترهایی مانند تحرک کل و پیش‌رونده، سرعت مسیر منحنی، سرعت خط مستقیم، سرعت مسیر میانگین، خطی‌بودن، مستقیم بودن، دامنه جابه‌جایی جانبی سر اسپرم و فرکانس تقاطع ضربان را به‌صورت کمی گزارش می‌کند. هدف از این مطالعه مروری، بررسی اصول عملکرد CASA، عوامل فنی و زیستی مؤثر بر نتایج، کاربردهای بالینی و پژوهشی و ارزش این سامانه در ارزیابی باروری سگ نر است. شواهد نشان می‌دهد که CASA، پس از اعتبارسنجی اختصاصی برای هر گونه و استانداردسازی عواملی مانند دما، نوع رقیق‌کننده، غلظت نمونه، نوع و عمق محفظه شمارش و نرخ فریم، ابزاری سریع، عینی و تکرارپذیر برای ارزیابی کمی حرکت اسپرم است. CASA در مقایسه رقیق‌کننده‌ها، پایش فرایندهای سردسازی و انجماد، تحلیل زیر جمعیت‌های حرکتی اسپرم، ارزیابی اسپرم اپیدیدیمی، بررسی مداخلات تغذیه‌ای، مطالعات سم‌شناسی و تلفیق داده‌های اسپرم با تصویربرداری بیضه کاربرد دارد. باوجود مشاهده تفاوت در برخی پارامترهای CASA میان سگ‌های بارور و نابارور، این سامانه باروری را به‌طور مستقیم اندازه‌گیری نمی‌کند؛ بنابراین، نتایج آن باید در کنار تاریخچه تولیدمثلی، معاینه دستگاه تناسلی، تعداد اسپرم متحرک، مورفولوژی اسپرم، سلامت غشا و آکروزوم، یکپارچگی DNA اسپرم تفسیر شود.

واژه‌های کلیدی: سگ نر، باروری، اسپرم، آنالیز رایانه‌ای اسپرم، تلقیح مصنوعی، انجماد اسپرم

مقدمه

تعداد جفت‌گیری‌ها یا تلقیح‌ها، وضعیت باروری سگ‌های ماده و پیامدهای واقعی آبستنی تعریف و تفسیر شوند. در ارزیابی صلاحیت تولیدمثلی، هیچ آزمونی نمی‌تواند به‌تنهایی احتمال ایجاد آبستنی و تولد توله‌های زنده را با دقت کامل پیش‌بینی کند (۷، ۱۲).

تحرک اسپرم یکی از نخستین شاخص‌هایی است که پس از جمع‌آوری منی ارزیابی می‌شود. حرکت پیش‌رونده اسپرم برای عبور از دستگاه تناسلی ماده، رسیدن به محل لقاح و

باروری در سگ نر روندی ساده و دو حالتی نیست، بلکه حاصل تعامل مجموعه‌ای از عوامل، از جمله تولید اسپرم در بیضه، بلوغ اسپرم در اپیدیدیم، ترشحات غدد ضمیمه جنسی، توانایی جفت‌گیری یا جمع‌آوری منی، کیفیت انتقال و نگهداری نمونه و نیز عوامل مرتبط با سگ ماده و مدیریت مراحل تولیدمثل است. از این‌رو، اصطلاح‌هایی مانند بارور، کم بارور و نابارور باید با احتیاط و بر پایه تاریخچه تولیدمثلی،





مشارکت در نفوذ به پوشش‌های اطراف تخمک اهمیت دارد. بااین‌حال، ارزیابی چشمی تحرک به عواملی مانند تجربه مشاهده‌گر، ضخامت لایه نمونه، دما، فاصله زمانی میان جمع‌آوری و ارزیابی و نحوه انتخاب میدان میکروسکوپی وابسته است و معمولاً تنها برآوردی کلی از درصد اسپرم‌های متحرک یا دارای حرکت پیش‌رونده ارائه می‌دهد. سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم یا (Computer-Assisted Sperm Analysis; CASA) باهدف کاهش ذهنی بودن این ارزیابی و تبدیل ویژگی‌های حرکتی اسپرم به داده‌های کمی توسعه‌یافته است (۵۱).

در سگ، سامانه‌های مختلف CASA، از جمله Sperm Vision، Hamilton-Thorne، Class Analyzer و ISAS، AndroVision، مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۳۷). مطالعات اعتبارسنجی نشان داده‌اند که در صورت تنظیم و اعتبارسنجی مناسب سیستم، تکرارپذیری بسیاری از پارامترهای حرکتی قابل‌قبول است؛ بااین‌حال، نتایج می‌توانند تحت‌تأثیر تغییر دما، نوع و عمق محفظه شمارش، نوع رقیق‌کننده، غلظت نمونه و تنظیمات نرم‌افزاری به طور معنی‌داری تغییر کنند (۱۶، ۲۰). افزون بر این، مطالعاتی با استفاده از تصویربرداری پرسرعت در سگ‌های متعلق به ۱۱ نژاد نشان داد که برخی متغیرهای حرکت‌شناسی اسپرم سگ، به‌ویژه سرعت مسیر منحنی یا VCL، در نرخ‌های فریم متداول به طور قابل‌توجهی کمتر از مقدار واقعی برآورد می‌شوند و تفاوت‌های بین نژادی نیز در برخی پارامترها وجود دارد (۴۱).

نتایج حاصل از سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم یا CASA باید در چارچوب یک ارزیابی جامع آندرولوژی تفسیر شوند. این ارزیابی با اخذ تاریخچه دقیق آغاز می‌شود و اطلاعاتی مانند سن، نژاد، سابقه باروری، میزان آبستنی سگ‌های ماده جفت‌گیری شده یا تلقیح شده، فاصله زمانی از آخرین انزال، سابقه بیماری‌های همراه با تب، داروهای مصرفی، تماس با مواد سمی، جراحی‌های پیشین، اختلالات میل جنسی و شرایط نگهداری، تغذیه و مدیریت تولیدمثل را در بر می‌گیرد.

در ادامه، معاینه عمومی و معاینه دستگاه تناسلی، شامل ارزیابی اندازه، تقارن و قوام بیضه‌ها و اپیدیدیم‌ها و بررسی کیسه بیضه، آلت، پیش‌پوست و پروستات انجام می‌شود. ارزیابی منی نیز باید ویژگی‌هایی مانند حجم و ظاهر نمونه، غلظت اسپرم، تعداد کل اسپرم، تعداد کل اسپرم‌های متحرک، تحرک، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم‌ها را شامل شود (۲۳).

نمونه انزال سگ معمولاً از سه بخش شامل بخش پیش اسپرمی یا کم اسپرم، بخش غنی از اسپرم و بخش پروستاتی تشکیل می‌شود. در بسیاری از مطالعات مبتنی بر CASA، بخش غنی از اسپرم به‌صورت جداگانه جمع‌آوری و ارزیابی می‌شود؛ زیرا میزان متغیر اختلاط آن با بخش پروستاتی می‌تواند حجم، غلظت و محیط فیزیکی‌شیمیایی نمونه را تغییر دهد و بر برخی پارامترهای حرکتی اسپرم اثر بگذارد. بااین‌حال، در بعضی مطالعات مربوط به نگهداری، سردسازی یا انجماد منی، بررسی اثر حضور یا افزودن مایع پروستات بخشی از هدف پژوهش است؛ بنابراین، برای تفسیر صحیح نتایج باید نوع بخش جمع‌آوری‌شده، حجم هر بخش و میزان اختلاط میان بخش‌های مختلف انزال به طور دقیق گزارش شود (۴۶).

ازاین‌رو، داده‌های حرکتی CASA باید در چارچوب ارزیابی جامع تولیدمثلی تفسیر شوند؛ ارتباط این شاخص‌ها با باروری واقعی و ضرورت استفاده از آزمون‌های مکمل در بخش‌های بعدی به طور اختصاصی بررسی می‌شود.

هدف این مقاله، ارائه مروری جامع و تحلیلی بر نقش CASA در ارزیابی باروری سگ نر است و بررسی اینکه CASA کدام ویژگی‌های حرکتی اسپرم را با دقت اندازه‌گیری می‌کند، چه عوامل فنی و زیستی بر نتایج آن تأثیر می‌گذارند، این سامانه در کدام کاربردهای بالینی و پژوهشی بیشترین ارزش را دارد و چرا نباید داده‌های حرکتی حاصل از آن را معادل باروری واقعی تلقی کرد.



پروپ‌های مناسب، امکان ارزیابی زنده‌مانی و بعضی شاخص‌های عملکردی دیگر را نیز فراهم می‌کنند (۴۵، ۵۴). باوجود استفاده از عنوان «خودکار»، نظارت کاربر همچنان بخش مهمی از فرایند تحلیل CASA محسوب می‌شود. اپراتور باید صحت شناسایی اسپرم‌ها، تفکیک آن‌ها از ذرات زائد و سلول‌های غیر اسپرم، عدم وجود جریان مایع یا حرکت رانشی ناشی از بارگذاری نامناسب محفظه و صحت بازسازی مسیرهای حرکتی را بررسی کند (۵۳). این کنترل می‌تواند از طریق مشاهده مستقیم تصاویر و در صورت وجود قابلیت مربوطه، با بازبینی ویدئوها یا فریم‌های ثبت‌شده انجام شود. عواملی مانند آماده‌سازی نمونه، غلظت اسپرم، نرخ ثبت فریم و عمق محفظه شمارش نیز می‌توانند بر دقت و تکرارپذیری نتایج اثرگذار باشند (۴۹).

علاوه بر این، سامانه‌های CASA ممکن است از نظر الگوریتم‌های شناسایی و ردیابی سلول، روش‌های هموارسازی مسیر، نحوه بازسازی مسیر میانگین حرکت و آستانه‌های طبقه‌بندی تحرک با یکدیگر تفاوت داشته باشند؛ بنابراین، استفاده از یک نام مشترک برای یک پارامتر مانند (VAP) الزاماً به معنی محاسبه کاملاً یکسان آن در نرم‌افزارهای مختلف نیست. این تفاوت‌ها، همراه با عواملی مانند نوع دوربین و سیستم اپتیکی، نرخ فریم، عمق محفظه، دمای آنالیز، غلظت نمونه و تنظیمات نرم‌افزار، باعث می‌شوند مقادیر مرجع و آستانه‌های طبقه‌بندی حاصل از CASA بدون ذکر نام سامانه، نسخه نرم‌افزار و پروتکل تحلیل، قابلیت مقایسه محدودی داشته باشند (۲۸).

پارامترهای اصلی CASA و مفهوم زیستی آن‌ها

پارامترهای CASA باید به‌صورت مجموعه‌ای تفسیر شوند. سه سرعت اصلی، تصویر متفاوتی از حرکت ارائه می‌کنند: VCL سرعت روی مسیر واقعی و پریپیچ‌وخم است؛ VSL سرعت جابه‌جایی مستقیم از ابتدا تا انتهای مسیر؛ و VAP سرعت روی مسیر میانگین هموار شده (۲۰). نسبت‌های STR، LIN و WOB شکل و کارایی مسیر را

اجزاء عملکرد و حوزه‌های کاربرد سامانه‌های CASA

یک سامانه متداول CASA از میکروسکوپ مجهز به اپتیک فاز کنتراست، صفحه گرم‌شونده (Heated Microscope Stage) برای حفظ دمای نمونه، دوربین دیجیتال باقابلیت ثبت تصاویر متوالی، محفظه شمارش با عمق استاندارد، رایانه و نرم‌افزار تخصصی پردازش و تحلیل تصویر تشکیل می‌شود. نرم‌افزار، اشیای متناظر با سر اسپرم را بر اساس ویژگی‌هایی مانند اندازه، شکل، شدت روشنایی و کنتراست از زمینه تفکیک می‌کند، مختصات مرکز سر اسپرم را در فریم‌های متوالی تعیین می‌کند و با اتصال این مختصات، مسیر حرکت هر سلول را بازسازی می‌کند. سپس پارامترهای تحرک و حرکت‌شناسی، از جمله سرعت و ویژگی‌های هندسی مسیر، محاسبه می‌شوند. خروجی سامانه معمولاً شامل درصد اسپرم‌های متحرک، پیش‌رونده، غیرپیش‌رونده و بی‌حرکت است و برخی نرم‌افزارها اسپرم‌های متحرک را بر اساس آستانه‌های تعریف‌شده به طبقات سرعتی سریع، متوسط و کند نیز تقسیم می‌کنند. این آستانه‌ها به سامانه، تنظیمات نرم‌افزار و گونه مورد بررسی وابسته‌اند (۳۶، ۳۸).

کاربردهای سامانه CASA معمولاً به سه بخش تقسیم می‌شوند: CASA-Mot (Computer-Assisted Sperm Motility Analysis) برای ارزیابی تحرک و پارامترهای حرکت‌شناسی، CASA-Conc (Computer-Assisted Sperm Concentration Analysis) برای برآورد غلظت و CASA-Morph (Computer-Assisted Sperm Morphology Analysis) برای تحلیل مورفولوژی و مورفومتری اسپرم (Sperm Morphometry). اصطلاح CASMA (Computer-Assisted Sperm Morphometric Analysis) نیز به‌طور خاص برای تحلیل رایانه‌ای مورفومتری اسپرم، به‌ویژه ابعاد و شکل سر اسپرم، به‌کاررفته است.

برخی پلتفرم‌های یکپارچه، در صورت برخورداری از تجهیزات تصویربرداری فلورسانس و استفاده از رنگ‌ها یا





توصیف می‌کنند. ALH نوسان جانبی سر و BCF تعداد تقاطع مسیر واقعی با مسیر میانگین را نشان می‌دهد (۲۴). همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، خروجی CASA مجموعه‌ای از شاخص‌های مکمل را در بر می‌گیرد

و تفسیر یک پارامتر منفرد، بدون توجه به سایر شاخص‌های سرعت و شکل مسیر، می‌تواند گمراه‌کننده باشد.

جدول ۱- پارامترهای رایج در تحلیل رایانه‌ای تحرک اسپرم (۸، ۱۵، ۱۶ و ۱۹)

مخفف	عنوان	تعریف و نکته تفسیری
TM یا MOT	تحرک کل	درصد اسپرم‌هایی که طبق معیارهای حرکتی تعریف شده توسط نرم‌افزار CASA متحرک شناسایی می‌شوند.
PM یا PMOT	تحرک پیش‌رونده	درصد اسپرم‌هایی که دارای حرکت مؤثر روبه‌جلو هستند؛ تعریف آن معمولاً به ترکیبی از VAP، VSL، STR و/یا LIN وابسته است.
VCL	سرعت منحنی	سرعت حرکت اسپرم بر اساس مسیر واقعی طی شده؛ به نرخ ثبت فریم و دقت بازسازی مسیر حساس است.
VSL	سرعت خط مستقیم	سرعت جابه‌جایی مستقیم اسپرم از نقطه شروع تا پایان مسیر؛ نشان‌دهنده کارایی حرکت خالص است.
VAP	سرعت مسیر میانگین	سرعت حرکت اسپرم بر اساس مسیر میانگین شده؛ تحت تأثیر الگوریتم هموارسازی نرم‌افزار قرار می‌گیرد.
LIN	خطی بودن	نسبت $VSL/VCL \times 100$ ؛ نشان‌دهنده میزان مستقیم بودن مسیر حرکت اسپرم است.
STR	مستقیم بودن	نسبت $VSL/VAP \times 100$ ؛ یکی از پارامترهای مورد استفاده در تعریف حرکت پیش‌رونده است.
WOB	نوسان مسیر	نسبت $VAP/VCL \times 100$ ؛ بیان‌کننده میزان تطابق مسیر میانگین با مسیر واقعی حرکت است.
ALH	دامنه جابه‌جایی جانبی سر	میزان انحراف جانبی سر اسپرم از مسیر حرکت؛ همراه با تغییرات الگوی حرکت تاژک مرتبط است.
BCF	فرکانس تقاطع ضربان	تعداد دفعات تقاطع مسیر واقعی اسپرم با مسیر میانگین در واحد زمان؛ وابسته به نرخ فریم و الگوریتم تحلیل است.
Static/owSI/Medium/Rapid	طبقات سرعت	دسته‌بندی اسپرم‌ها بر اساس آستانه‌های سرعت تعیین شده توسط نرم‌افزار؛ این آستانه‌ها بین سامانه‌های مختلف یکسان نیستند.

دستگاه‌ها در نظر گرفت. به عنوان نمونه، در منی تازه سگ‌های نژاد Crested Chinese، میانگین تحرک کل در گروه‌های

در سگ، مقادیر این شاخص‌ها به سن، نژاد، سامانه و تنظیمات تحلیل وابسته‌اند و نباید یک حد واحد برای همه



برای شناسایی الگوی بیش فعال مطرح شدند؛ باین حال، بر محدودیت داده‌های اعتبارسنجی تأکید شد (۳۸).

استانداردسازی

مهم‌ترین پیام مطالعات انجام‌شده در سگ این است که CASA در صورت نبود استانداردسازی مناسب، اگرچه می‌تواند خطای مشاهده‌گر را کاهش دهد، اما ممکن است خود به منبع جدیدی از تغییرپذیری بین آزمایشگاه‌ها تبدیل شود. مطالعات انجام‌شده با سامانه‌های Hamilton-Thorne و SpermVision نشان داده‌اند که عواملی مانند دمای تحلیل، نوع محفظه شمارش، غلظت نمونه، نوع رقیق‌کننده و تنظیمات نرم‌افزاری می‌توانند بر درصد تحرک و پارامترهای حرکت‌شناسی (Kinematic Parameters) اسپرم اثرگذار باشند (۲۱).

دمای تحلیل

تحرک اسپرم سگ به شرایط دمایی حساس است. اندازه‌گیری در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد، در مقایسه با ۳۰ درجه، برای بسیاری از پارامترهای حرکتی مقادیر بالاتری ایجاد کرده و شرایط مناسب‌تری برای بازتاب وضعیت فیزیولوژیک گزارش شده است. بسیاری از پروتکل‌های CASA در سگ از دماهای نزدیک به شرایط فیزیولوژیک (۳۷ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد) استفاده کرده‌اند. برای کاهش تغییرپذیری، دمای محفظه شمارش، لام، رقیق‌کننده و صفحه میکروسکوپ باید کنترل و یکنواخت شود و زمان کافی برای رسیدن نمونه به دمای هدف در نظر گرفته شود. باین حال، نگهداری طولانی‌مدت نمونه در شرایط گرم نیز می‌تواند باعث تغییر تدریجی الگوی حرکتی شود (۱۷).

غلظت و رقیق‌سازی

منی تازه سگ اغلب برای ردیابی دقیق بیش از حد غلیظ است. برخورد اسپرم‌ها، هم‌پوشانی سرها و خروج سریع سلول از میدان می‌تواند مسیرها را مختل کند. در مقابل، رقیق‌سازی بیش از حد ممکن است از طریق تغییر ترکیب یونی، کاهش

سنی ۱ تا ۳، ۴ تا ۶ و ۷ تا ۱۰ سال به ترتیب ۴/۸۴، ۳/۷۳ و ۹/۵۳ درصد و میانگین تحرک پیش‌رونده به ترتیب ۹/۶۷، ۳/۵۵ و ۷/۲۵ درصد گزارش شده است. در همین گروه‌ها، VCL به ترتیب ۳/۱۷۵، ۸/۱۷۱ و ۸/۱۵۵، VAP برابر ۵/۱۴۰، ۶/۱۳۶ و ۹/۱۱۲ و VSL برابر ۸/۱۱۲، ۷/۹۹ و ۹۱ میکرومتر بر ثانیه بوده است (۱۹). این مقادیر نمونه‌ای از داده‌های اختصاصی سگ هستند و به دلیل وابستگی نتایج CASA به پروتکل و دستگاه، نباید به‌عنوان حدود مرجع جهان‌شمول تلقی شوند.

تحرک پیش‌رونده و تعداد کل اسپرم متحرک

در تصمیم‌گیری‌های بالینی، درصد تحرک نباید به‌صورت مستقل از حجم و غلظت اسپرم تفسیر شود. برای مثال، نمونه‌ای با ۸۰ درصد تحرک، اما با تعداد کل اسپرم پایین، ممکن است تعداد کافی اسپرم قابل‌استفاده برای تلقیح فراهم نکند؛ درحالی‌که نمونه‌ای با تحرک متوسط ولی تعداد کل اسپرم بالا می‌تواند تعداد بیشتری اسپرم متحرک پیش‌رونده در اختیار قرار دهد؛ بنابراین، محاسبه تعداد کل اسپرم‌های متحرک و در صورت امکان تعداد کل اسپرم‌های متحرک پیش‌رونده، نسبت به اتکا به درصدهای تحرک، ارزش بالینی بیشتری دارد (۱۹).

بیش‌فعالی و ظرفیت‌یابی (Hyperactivation and capacitation)

حرکت بیش‌فعال معمولاً با افزایش VCL و ALH و کاهش LIN مشخص می‌شود و از نظر زیستی با تغییرات حرکتی اسپرم در طی فرایند ظرفیت‌یابی و افزایش توانایی حرکت در محیط‌های پیچیده و ویسکوز دستگاه تناسلی ماده مرتبط است. باین حال، آستانه‌های تعریف بیش‌فعالی وابسته به گونه، سامانه CASA و الگوریتم تحلیل بوده و یک معیار اختصاصی برای سگ وجود ندارد. در مطالعه‌ای با استفاده از سامانه SpermVision، مقادیر ALH بیشتر از ۵/۶ میکرومتر، LIN کمتر از ۵/۰ و VCL بیشتر از ۱۱۸ میکرومتر بر ثانیه به‌عنوان معیارهای پیشنهادی و قابل تنظیم





VCL حساس‌ترین متغیر نسبت به کاهش نرخ فریم بود؛ درحالی‌که پارامترهایی مانند LIN و STR در نرخ‌های پایین‌تر پایداری بیشتری نشان دادند (۳۶). BCF نیز نیازمند نرخ بالا بود، درحالی‌که LIN و STR از حدود ۱۰۰ فریم به بعد پایدارتر شدند.

این یافته نشان می‌دهد که مقایسه مستقیم مقادیر حرکت‌شناسی حاصل از سامانه‌ها یا مطالعات با نرخ‌های فریم متفاوت می‌تواند گمراه‌کننده باشد.

بنابراین، گزارش دقیق نرخ فریم و پرهیز از انتقال مستقیم آستانه‌های تعریف‌شده در یک دستگاه به دستگاه دیگر ضروری است. اگرچه نرخ‌های بسیار بالا دقت تحلیل حرکت‌شناسی را افزایش می‌دهند، اما هزینه، حجم داده و نیاز پردازشی بیشتری ایجاد می‌کنند و همیشه برای کاربردهای بالینی عملی نیستند.

تعداد فریم، میدان و سلول

هرچه تعداد سلول بیشتر باشد، برآورد جمعیت پایدارتر است، اما افزایش میدان‌ها زمان و احتمال تغییر دما یا حرکت نمونه را افزایش می‌دهد. در مطالعات مورد بررسی، از ۵ میدان و حداقل ۵۰۰ اسپرم تا ۱۵ میدان یا ۳۰۰۰ اسپرم استفاده شده است (۹، ۴۲).

معیار مناسب باید پیش از مطالعه تعیین شود و ضریب تغییرات تکرارهای فنی ثبت گردد. انتخاب دستی «بهترین میدان‌ها» باعث سوگیری می‌شود؛ میدان‌ها باید به‌صورت سیستماتیک یا تصادفی و با پرهیز از لبه‌های محفظه شمارش انتخاب شوند (۱۱، ۲۲).

جدول ۲ نشان می‌دهد که تغییرپذیری نتایج CASA فقط به ویژگی زیستی نمونه محدود نیست و مراحل جمع‌آوری، زمان تا تحلیل، دما، غلظت و رقیق‌سازی، نوع محفظه شمارش، نرخ فریم، تنظیمات نرم‌افزار و عملکرد اپراتور همگی باید استاندارد و گزارش شوند.

عوامل حمایتی پلاسمای منی و افزایش نسبت سطح به حجم، حرکت را کاهش دهد. با افزایش رقیق‌سازی، برآورد غلظت بیش از حد و کاهش برخی پارامترهای تحرک مشاهده می‌شود. رقیق‌کننده صرفاً وسیله کاهش غلظت نیست و می‌تواند حرکت و سلامت غشا را تغییر دهد. در مطالعه ۴۰ انزال، TRIS و ترشحات اتولوگ پروستات کمترین اثر منفی را داشتند، درحالی‌که PBS و سرم فیزیولوژی بسیاری از پارامترهای حرکت را کاهش دادند و PBS آسیب غشایی بیشتری ایجاد کرد (۳۸)؛ بنابراین استفاده از آب، سالین یا PBS به‌عنوان محیط خنثی و قابل‌تعمیم صحیح نیست. ترکیب یونی، اسمولاریته، pH، منبع انرژی و ویسکوزیته باید در نظر گرفته شود.

نوع و عمق محفظه شمارش

نوع محفظه شمارش، عمق لایه مایع، جریان نمونه، توزیع سلول‌ها و میزان آزادی حرکت اسپرم را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. در مطالعات مختلف سگ از محفظه شمارش‌های با عمق ثابت مانند محفظه شمارش‌های ۲۰ میکرومتری یا سیستم‌های لام و لامل استفاده شده است. با این حال، لام و لامل عمق کاملاً استاندارد ایجاد نمی‌کنند و عواملی مانند فشار لامل، حجم قطره و تبخیر می‌تواند باعث تغییر نتایج شود. برای مقایسه بین مطالعات و آزمایشگاه‌ها، ثبت دقیق نوع محفظه شمارش، عمق، حجم نمونه و شرایط قرائت ضروری است.

نرخ فریم، چالش جدید در اسپرم سگ

مطالعات کلاسیک CASA در سگ عمدتاً از نرخ‌های ۳۰ یا ۶۰ فریم بر ثانیه استفاده کرده‌اند. با این حال، مطالعه Sevilla و همکاران با ثبت تصاویر در ۵۰۰ فریم بر ثانیه و بررسی ۹۷ انزال از ۴۹ سگ متعلق به ۱۱ نژاد نشان داد که برخی پارامترهای حرکت‌شناسی، به‌خصوص VCL و BCF، به‌شدت تحت‌تأثیر نرخ فریم قرار دارند.



جدول ۲- مهم ترین منابع تغییر پذیری در CASA و اقدامات کنترلی پیشنهادی

مرحله	منبع خطا	اقدام استاندارد سازی
جمع آوری	جداسازی ناقص بخش غنی از اسپرم، تحریک ناکافی، آلودگی با ادرار یا خون	ثبت بخش های انزال، استفاده از ظرف گرم، گزارش زمان پرهیز و کیفیت جمع آوری
زمان	کاهش یا تغییر تحرک در فاصله جمع آوری تا تحلیل	تعیین سقف زمانی ثابت؛ ثبت زمان دقیق
دما	تفاوت حرکت در ۳۰، ۳۷ و ۳۸ درجه	گرم کردن محفظه شمارش، لام و رقیق کننده و پایش دما
غلظت	برخورد در غلظت بالا؛ اثر رقیق سازی در غلظت پایین	اعتبار سنجی محدوده غلظت برای هر سامانه
رقیق کننده	تغییر pH، اسمولاریته، غشا و متابولیسم	استفاده ثابت از محیط اعتبار سنجی شده و ذکر ترکیب
محفظه شمارش	اثر عمق، جریان و توزیع سلول	نام، عمق، حجم، زمان نشست و یکسان سازی محل قرائت
نرخ فریم	کم برآوردی VCL و BCF در نرخ پایین	گزارش fps؛ ترجیح نرخ بالا برای مطالعات حرکت شناسی سگ
نرم افزار	اختلاف آستانه و الگوریتم هموار سازی	ذکر مدل، نسخه و تمام مقدار حدی ها
ذرات زائد/زرده	شناسایی غلط ذرات به عنوان اسپرم	کنترل ویدئو، فیلتر مناسب و تنظیم اندازه/کنتراست
اپراتور	انتخاب میدان و پذیرش مسیرهای اشتباه	آموزش، دستورالعمل مکتوب و کنترل کیفیت بین اپراتوری

عوامل زیستی مؤثر بر نتایج

سن، وزن و سابقه تولید مثلی

سن، اندازه بدن و سابقه تولید مثلی از عوامل مهم مؤثر بر پارامترهای اسپرم در سگ هستند. در مطالعه ای روی ۱۱۱ سگ، افزایش سن با کاهش درصد اسپرم های دارای مورفولوژی طبیعی همراه بود و وزن بدن با تعداد کل اسپرم و برخی متغیرهای حرکت شناسی ای ارتباط نشان داد (۳۰)؛ بنابراین، تفسیر نتایج CASA و تعریف حدود مرجع بدون در نظر گرفتن سن و جثه حیوان می تواند گمراه کننده باشد. مطالعات اخیر نیز تفاوت های مرتبط بانژاد را در تحرک، غلظت و الگوهای حرکتی اسپرم گزارش کرده اند (۳۶). اگرچه ایجاد دامنه های مرجع نژاد محور می تواند رویکردی دقیق تر باشد، اما برای بسیاری از نژادها تعداد نمونه کافی وجود ندارد و این

خطر وجود دارد که تفاوت های طبیعی بین نژادها به اشتباه به عنوان وضعیت غیر طبیعی تفسیر شوند.

نژاد

مطالعات اخیر با استفاده از تحلیل پرسرعت CASA، تفاوت معنی داری در برخی متغیرهای حرکت شناسی میان نژادهای مختلف سگ گزارش کرده اند. در این مطالعات، نژادهایی مانند French Bulldog، Jack Russell، Giant Schnauzer و Golden Retriever در برخی شاخص های تحرک کل و تحرک سریع مقادیر بالاتری نشان دادند، در حالی که Dachshund و Miniature Schnauzer در برخی پارامترها مقادیر پایین تری داشتند (۴۰). این تفاوت ها ممکن است حاصل ترکیبی از عوامل زیستی مرتبط بانژاد، اندازه بدن، تفاوت های ژنتیکی، شرایط





بالاتری نشان دادند (۱۵). این یافته‌ها نشان می‌دهد CASA می‌تواند در شناسایی نمونه‌های دارای اختلال واضح کیفیت اسپرم مفید باشد؛ باین‌حال، هم‌پوشانی قابل توجه بین گروه‌ها و نبود استاندارد واحد، استفاده از مقدار حدی قطعی برای پیش‌بینی باروری را محدود می‌کند.

سردسازی و انتقال منی

در نمونه‌های سرد شده، هدف اصلی حفظ تحرک و عملکرد اسپرم طی چند ساعت تا چند روز نگهداری و انتقال است. CASA امکان بررسی روند کاهش تحرک و سرعت، مقایسه رقیق‌کننده‌ها، دماهای نگهداری، افزودنی‌ها و روش‌های آماده‌سازی نمونه را فراهم می‌کند. ارزش CASA در این کاربرد صرفاً به یک اندازه‌گیری نقطه‌ای محدود نمی‌شود، بلکه بررسی پایداری حرکت در طول زمان و آزمون دوام (Longevity Test) می‌تواند اطلاعات بیشتری درباره توانایی نمونه برای حفظ کیفیت طی انتقال ارائه دهد. باین‌حال، وجود ذرات کدرکننده مانند زرده تخم‌مرغ یا برخی اجزای رقیق‌کننده‌ها ممکن است شناسایی و ردیابی اسپرم را مختل کند و تنظیمات معتبر برای منی تازه الزاماً برای نمونه‌های سرد شده قابل انتقال نیستند (۱۸، ۴۴).

انجماد و ذوب

فرایند انجماد و ذوب می‌تواند باعث آسیب به غشا، آکروزوم، میتوکندری، DNA و ساختار تاژک اسپرم شود. کاهش تحرک کل (TM) و تحرک پیش‌رونده (PM) پس از ذوب تنها بخشی از این آسیب‌ها را نشان می‌دهد و تغییر در پارامترهای حرکت‌شناسی مانند VSL، VCL و ALH و توزیع زیر جمعیت‌های حرکتی ممکن است اطلاعات حساس‌تری فراهم کند.

مطالعات چند پارامتری نشان داده‌اند که ارزیابی CASA پس از انجماد بهتر است همراه با آزمون‌های ارزیابی غشا، سلامت آکروزوم، عملکرد میتوکندری و شاخص‌های استرس اکسیداتیو تفسیر شود (۳۱، ۴۲). همچنین، مرور

نگهداری و مدیریت تولیدمثلی باشند. همچنین، میزان وابستگی برخی شاخص‌ها، به‌ویژه VCL، به نرخ فریم نشان می‌دهد که حتی شرایط تحلیل می‌تواند بر مقایسه بین نژادها اثرگذار باشد.

فاصله انزال، فصل، بیماری و عوامل محیطی

فاصله بین انزال‌ها می‌تواند بر ذخایر اپیدیدیمی و ترکیب سلولی انزال اثر بگذارد. جمع‌آوری با فاصله‌های بسیار کوتاه ممکن است باعث کاهش تعداد کل اسپرم شود، درحالی‌که دوره‌های طولانی‌تر پرهیز می‌توانند با افزایش تجمع اسپرم‌های پیر و تغییر در برخی شاخص‌های کیفیت اسپرم همراه باشند. علاوه بر این، عوامل سیستمیک مانند بیماری‌های تبار، استرس گرمایی، اختلالات بیضه و پروستات، مصرف برخی داروها و مواجهه با مواد شیمیایی می‌توانند بر تحرک و سایر ویژگی‌های اسپرم اثرگذار باشند. در یک مطالعه طولی روی سگ‌های مولد، کاهش تدریجی برخی شاخص‌های تحرک در طول زمان و ارتباط میان مواجهه با برخی آلاینده‌ها و تغییرات پارامترهای اسپرم گزارش شد (۲۴). این یافته‌ها اهمیت استفاده از CASA در مطالعات پایش سلامت تولیدمثلی و ارزیابی اثر عوامل محیطی را نشان می‌دهد؛ باین‌حال، برای اثبات رابطه علی میان مواجهه‌های محیطی و کاهش باروری، کنترل دقیق عوامل مخدوش‌کننده ضروری است.

کاربرد CASA در انواع نمونه و مداخلات

منی تازه و ارزیابی کاهش باروری

در منی تازه، CASA امکان مستندسازی عینی تحرک، مقایسه انزال‌های متوالی و بررسی تغییرات ناشی از درمان یا اصلاح مدیریت تولیدمثلی را فراهم می‌کند. در مطالعه‌ای روی ۴۶ سگ، حیوانات با سابقه کاهش موفقیت باروری، در مقایسه با سگ‌های بارور، غلظت اسپرم، تحرک کل (MOT)، VAP، VSL، VCL، BCF، درصد اسپرم‌های سریع و سایر شاخص‌های حرکتی پایین‌تر و درصد اسپرم‌های بی‌حرکت



و قرمز همراه بود، درحالی که تغییر معنی داری در تستوسترون یا شاخص های بیوشیمیایی مشاهده نشد (۲۲). باوجود طراحی متقاطع، تعداد بسیار محدود حیوانات، نبود ارزیابی مستقیم پیامد باروری و احتمال اثرات دوره ای و انتقالی، تعمیم این یافته ها محدود است. این مطالعه نمونه ای از این موضوع است که تغییرات معنی دار در پارامترهای CASA الزاماً به معنی افزایش باروری واقعی نیست (۳).

همچنین، در یک مطالعه بین گونه ای روی اسپرم گاو، تابش نور قرمز در جریان جداسازی به روش Swim-up موجب ایجاد تفاوت معنی دار در اغلب پارامترهای CASA، به ویژه در زمان های ۱۰ و ۳۰ دقیقه، شد؛ این نتیجه کاربرد CASA را در شناسایی تغییرات حرکتی ناشی از مداخلات فیزیکی نشان می دهد (۴).

پایه های ژنتیکی مرتبط با کیفیت اسپرم

Cassatella و همکاران CASA را همراه با FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) برای بررسی ارتباط بین پارامترهای حرکتی اسپرم و تغییرات تعداد رونوشت ژن های مرتبط با اسپرماتوژنز در ۱۲ سگ به کار بردند. تفاوت هایی در نواحی ژنی شامل DNMT2، TEKT1 و SOX8 میان نمونه هایی با کیفیت متفاوت اسپرم مشاهده شد (۱۱). این یافته ها باتوجه به حجم نمونه کوچک و ناهمگونی نژادی، بیشتر جنبه فرضیه ساز دارند و نیازمند تکرار در جمعیت های بزرگ تر هستند. با این حال، نشان می دهند CASA می تواند یک فنوتیپ کمی استاندارد برای ارتباط دادن ویژگی های حرکتی اسپرم با داده های ژنومی فراهم کند.

در پژوهشی دیگر روی اسپرم سگ، اسپرم های پرتحرک در مقایسه با اسپرم های کم تحرک، طول تلومر بیشتر و مقادیر بالاتری از چندین پارامتر حرکتی CASA شامل VCL، VSL، LIN، STR، ALH و BCF داشتند. همچنین، بیان ژن TRF2 در اسپرم های کم تحرک بیشتر بود، درحالی که بیان TRF1 میان دو گروه تفاوت معنی داری نداشت؛ این یافته ها نشان می دهند که فنوتیپ حرکتی

مطالعات پیش بینی تحمل انجماد نشان داده است که تفاوت فردی بین سگ ها قابل توجه است و ویژگی های پیش از انجماد و الگوهای حرکتی زیر جمعیتی می توانند در شناسایی اسپرم های با قابلیت انجماد بهتر یا ضعیف تر کمک کننده باشند (۳۹).

اسپرم اپیدیدیمی

جمع آوری اسپرم اپیدیدیمی در شرایطی مانند اخته سازی، مرگ ناگهانی یا عدم امکان استفاده از حیوان مولد، می تواند آخرین فرصت برای حفظ ذخیره ژنتیکی باشد. این نمونه ها از نظر ترکیب مایع اطراف اسپرم و مرحله بلوغ سلولی با منی انزالی تفاوت دارند؛ بنابراین، استفاده مستقیم از تنظیمات CASA و مقادیر مرجع مربوط به منی انزالی، بدون اعتبارسنجی اختصاصی، می تواند باعث تفسیر نادرست شود.

در مطالعه Bernklau و همکاران، انکوباسیون بافت دم اپیدیدیم به مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه در سالیان از نظر تعداد اسپرم، تحرک و زنده ماندن تفاوت معنی داری ایجاد نکرد. پس از انجماد نیز، رقیق کننده های Uppsala و Optixcell تحرک بالاتری نسبت به Tris ایجاد کردند (۹). در این مطالعه، CASA به عنوان ابزاری برای مقایسه کارایی بازایی و حفاظت رقیق کننده ها استفاده شد و نه به عنوان روشی برای اثبات مستقیم باروری. در یک مطالعه بین گونه ای روی اسپرم اپیدیدیمی قوچ نیز از CASA برای بررسی اثر غلظت های مختلف پنتوکسی فیلین بر پارامترهای حرکتی استفاده شد و نتایج نشان دادند که پاسخ حرکتی اسپرم به این مداخله وابسته به غلظت است (۲).

ارزیابی مداخلات تغذیه ای و دارویی

CASA می تواند برای شناسایی تغییرات ظریف در کیفیت حرکت اسپرم پس از مداخلات تغذیه ای یا دارویی مورد استفاده قرار گیرد. در یک مطالعه متقاطع روی سه سگ Beagle، مصرف جینسینگ سیاه به مدت ۶۰ روز با بهبود برخی پارامترهای تحرک و سرعت نسبت به جینسینگ سفید





ثبت شده با CASA می‌تواند با برخی شاخص‌های مولکولی و ساختاری اسپرم ارتباط داشته باشد (۵).

تلفیق CASA با تصویربرداری بیضه

در مطالعه‌ای روی ۲۱ سگ سالم، از سونوگرافی کنتراست‌دار (Contrast-Enhanced Ultrasonography) (CEUS) همراه با CASA و فلوسایتمتری (Flow Cytometry) برای ارزیابی عملکرد تولیدمثلی استفاده شد. سفتی بافت بیضه با غلظت اسپرم، تحرک، پارامترهای حرکت‌شناسی و سلامت غشا همبستگی متوسط نشان داد؛ درحالی‌که شاخص‌های داپلر عروقی ارتباط مشخصی با کیفیت منی نداشتند و برخی متغیرهای زمانی پرفیوژن با جمعیت‌های خاص اسپرم ارتباط داشتند (۶).

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (Principal Component Analysis) نشان داد که مؤلفه‌های اصلی اول ۹/۶۳ درصد از واریانس متغیرهای بررسی‌شده را توضیح می‌دهند. باتوجه‌به نبود ارزیابی پیامد آبستنی و محدود بودن نمونه‌گیری به یک انزال از هر حیوان، این یافته‌ها بیشتر برای درک فیزیولوژی بیضه و تولید فرضیه‌های جدید ارزشمند هستند تا تعیین حدود تشخیصی قطعی.

مطالعات پیشین نیز ارتباط‌هایی میان ویژگی‌های سونوگرافی بیضه و کیفیت منی گزارش کرده‌اند، اما نتایج حاصل از داپلر کاملاً یکسان نبوده است (۸، ۱۳)؛ بنابراین، تصویربرداری باید به‌عنوان ابزار مکمل معاینه بالینی و ارزیابی منی در نظر گرفته شود و نه جایگزین.

ارتباط CASA با باروری واقعی

شواهد موجود نشان می‌دهد برخی شاخص‌های CASA در گروه‌های دارای باروری متفاوت، اختلاف نشان می‌دهند، اما ارتباط آن‌ها با باروری واقعی کامل نیست. در مطالعه سگ‌های دارای سابقه شکست تولیدمثلی، بسیاری از پارامترهای سرعت و حرکت پایین‌تر گزارش شد (۲۷). همچنین مطالعات جمعیتی، تفاوت کیفیت منی را بر اساس

سابقه تولیدمثلی نشان داده‌اند (۱۰). بااین‌حال، مرورهای تخصصی تأکید کرده‌اند که تعداد محدودی از شاخص‌های ارزیابی منی سگ به طور قوی با پیامدهای *in vivo* اعتبارسنجی شده‌اند (۱۶، ۴۷).

علت اصلی این محدودیت آن است که آبستنی نتیجه تعامل مجموعه‌ای از عوامل شامل کیفیت اسپرم، تعداد کل و تعداد اسپرم‌های پیش‌رونده، زمان‌بندی نسبت به تخمک‌گذاری، کیفیت تخمک، سلامت رحم و لوله‌های رحمی، سن ماده، روش و محل تلقیح و مهارت اجرایی است. در استفاده از اسپرم منجمد، محل رسوب اسپرم نیز اهمیت دارد؛ مطالعات پیشین نشان داده‌اند که تلقیح داخل رحمی در مقایسه با تلقیح واژینال می‌تواند نرخ زایمان و اندازه زایمان را افزایش دهد (۴۸). همچنین کاهش دوز اسپرم منجمد در تلقیح داخل رحمی با کاهش نرخ زایمان و اندازه زایمان همراه بوده است (۳۰)؛ بنابراین، کاهش موفقیت تولیدمثلی را نمی‌توان بدون کنترل عوامل مربوط به ماده و مدیریت تولیدمثل، صرفاً به نتایج CASA نسبت داد.

کاربرد تشخیصی اصلی CASA شامل شناسایی موارد واضح آستنوزواسپرمی (Asthenozoospermia)، مقایسه طولی یک حیوان با خودش و مستندسازی تغییرات ناشی از نگهداری یا درمان است. برای پیش‌بینی باروری فردی، مدل‌های ترکیبی که تعداد کل اسپرم‌های پیش‌رونده، مورفولوژی، سلامت غشا، آکروزوم، DNA و عوامل مربوط به ماده را در نظر می‌گیرند، منطقی‌تر از اتکا به یک شاخص منفرد مانند VCL هستند.

آزمون‌های مکمل و رویکرد چندپارامتری

مورفولوژی و مورفومتری

سیستم‌های CASA-Morphometry قادر به اندازه‌گیری ویژگی‌های هندسی سر اسپرم مانند طول، عرض، مساحت، محیط و گردی هستند. مورفومتری رایانه‌ای می‌تواند تغییرات ظریفی را آشکار کند که با ارزیابی چشمی قابل تشخیص نیستند و برخی مطالعات نشان داده‌اند که

ساختاری و ظرفیت عملکردی اسپرم مطرح شده است. در مطالعه‌ای شامل ۲۶ انزال از ۱۸ سگ، غلظت proAKAP4 با تحرک پیش‌رونده و پارامترهای حرکت‌شناسی‌ای شامل VCL، VAP و VSL همبستگی مثبت نشان داد. همچنین، چهار مورد تلقیح با منی تازه به آبستنی منجر شد، اما تعداد محدود تلقیح‌ها برای نتیجه‌گیری درباره ارتباط این نشانگر با باروری یا اندازه زایمان کافی نبود (۳۸). مطالعه تکرار انزال‌ها نیز پایداری نسبی proAKAP4 و ارتباط آن با تحرک کل اسپرم را گزارش کرد (۱۹)؛ بنابراین، CASA در این رویکرد، فنوتیپ حرکتی را فراهم می‌کند و proAKAP4 می‌تواند اطلاعات عملکردی مکملی درباره کیفیت اسپرم ارائه دهد.

مطابق جدول ۳، آستانه‌ها و تنظیمات گزارش‌شده میان سامانه‌های مختلف CASA یکسان نیستند؛ بنابراین، مقادیر نرم‌افزاری هر دستگاه باید به‌صورت اختصاصی برای اسپرم سگ اعتبارسنجی شوند و انتقال مستقیم آستانه‌های یک سامانه یا گونه دیگر به سگ مناسب نیست.

مزایا و محدودیت‌های CASA

CASA با کاهش وابستگی به ارزیابی چشمی، امکان ثبت عینی مسیر حرکت هر اسپرم و تحلیل کمی ویژگی‌های حرکتی را فراهم می‌کند. این فناوری قابلیت بررسی صدها تا هزاران سلول را در مدت کوتاه، همراه با امکان ذخیره و بازبینی ویدئوها، فراهم کرده و می‌تواند تغییرات ظریف در سرعت، مسیر حرکت و زیر جمعیت‌های اسپرم را که در مشاهده معمولی قابل تشخیص نیستند، آشکار کند. همچنین، CASA ابزاری ارزشمند برای مقایسه رقیق‌کننده‌ها، روش‌های سردسازی و انجماد، بررسی اثر مداخلات دارویی و تغذیه‌ای، تحلیل زیر جمعیت‌های حرکتی و ایجاد مدل‌های چندمتغیره است. علاوه بر این، استفاده از CASA در پایش طولی یک حیوان و کنترل کیفیت آزمایشگاهی امکان ارزیابی دقیق‌تر تغییرات فردی و روندهای زمانی را فراهم می‌کند.

شاخص‌های پیش از انجماد ممکن است توان پیش‌بینی کیفیت پس از ذوب داشته باشند (۳۳).

با این حال، رنگ‌آمیزی، بزرگ‌نمایی، غلظت نمونه، انتخاب سلول‌ها و نرم‌افزار تحلیل می‌توانند نتایج مورفومتری را تغییر دهند و ارزیابی خودکار مورفولوژی نسبت به CASA-Mot پیچیده‌تر و زمان‌برتر است؛ بنابراین، ارزیابی مورفولوژی دستی توسط فرد آموزش‌دیده همچنان می‌تواند مکمل مهمی برای CASA-Mot باشد.

زنده‌مانی، غشا و آکروزوم

اسپرم ممکن است دارای حرکت قابل قبول باشد، اما هم‌زمان غشای ناپایدار یا آکروزوم آسیب‌دیده داشته باشد. روش‌های فلورسانس و فلوسایتومتری با استفاده از رنگ‌هایی مانند SYBR-14/PI و لکتین‌های متصل‌شونده به آکروزوم، امکان تفکیک جمعیت‌های دارای غشای سالم یا آسیب‌دیده را فراهم می‌کنند (۴۲). ترکیب CASA با ارزیابی چهار جمعیت مختلف غشا و آکروزوم نشان داد که حرکت اسپرم و تمامیت سلولی، ابعاد مکمل کیفیت اسپرم هستند (۶).

میتوکندری، استرس اکسیداتیو و DNA

سرعت حرکت اسپرم به تولید انرژی میتوکندریایی و سلامت ساختار تاژک وابسته است، اما CASA به‌تنهایی قادر به تعیین علت کاهش حرکت نیست. ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری، گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسیداسیون لیپیدی، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و قطعه‌قطعه شدن DNA می‌تواند سازوکارهای آسیب اسپرم را روشن کند. این موضوع به‌ویژه در فرایند انجماد اهمیت دارد، زیرا نمونه ممکن است بخشی از تحرک خود را حفظ کند، اما هم‌زمان دچار آسیب DNA یا کاهش سلامت غشا شده باشد (۲۹).

زیست‌نشانگر proAKAP4

proAKAP4 پیش‌ساز پروتئین ساختاری AKAP4 در غلاف فیبری تاژک است و به‌عنوان نشانگری از بلوغ



جدول ۳- آستانه‌های نرم‌افزاری و تنظیمات فنی برای ارزیابی اسپرم سگ با سامانه‌های CASA (۱۱، ۱۲، ۱۵، ۱۶)

سامانه	معیار	آستانه یا تنظیم گزارش شده	کاربرد
SpermVision	آستانه تشخیص حرکت	بی حرکت: $AOC > ۹,۵$ حرکت موضعی: $DSL > ۶,۰ \mu m$	تفکیک اسپرم بی حرکت از اسپرم دارای حرکت محدود یا موضعی. این دو شاخص به الگوریتم همان نرم‌افزار وابسته‌اند.
SpermVision	آستانه بیش فعالی	$VCL < ۱۱۸ s/\mu m$ $ALH > 6.5 \mu m$ $LIN > ۰/۵۰$	شناسایی الگوی حرکتی بیش فعال. این ترکیب یک معیار نرم‌افزاری پیشنهادی است و حد تشخیصی باروری یا ظرفیت یابی قطعی محسوب نمی‌شود.
SpermVision	طبقه‌بندی شکل مسیر	خطی: $STR < ۰,۹۰$; $LIN < ۰,۵۰$ غیرخطی: $STR \geq ۹۰,۰$; $LIN \leq ۰/۵۰$ منحنی: $DAP/Radius \leq ۳$; $LIN > ۰/۵۰$	تفکیک مسیرهای خطی، غیرخطی و منحنی. نتایج به روش هموارسازی مسیر و تعریف شاخص‌ها در نسخه نرم‌افزار وابسته‌اند.
- Hamilton Ceros Thorne ۱۲,۱	تنظیمات فنی پیشنهادی برای استانداردسازی اندازه‌گیری	$۵۰ \times 10^6 \text{ sperm/mL}$ 60 fps ۳۰ frames (۰,۵ s)	شرایط پیشنهادی برای دستیابی به نتایج عینی و استاندارد تحرک در این سامانه
Class Sperm Analyzer (SCA)	تنظیمات فنی نمونه‌برداری و افزایش تکرارپذیری	$۲۵ \times 10^6 \text{ mL/sperm}$ سه میدان و حداقل ۱۰۰ اسپرم ۶۰ frames at ۳۰ Hz	شرایط پیشنهادی برای افزایش قابلیت اعتماد و تکرارپذیری اندازه‌گیری. این موارد تنظیم نمونه‌برداری و تصویربرداری‌اند، نه حد باروری.
II IVOS- HT	آس آستانه‌های تشخیص سر اسپرم در پردازش تصویرگونه تشخیص سر اسپرم	تنظیم نهایی پیشنهادی: $HBM = ۱۴۰$; $AREA = ۴ \mu m^2$ محدوده دارای توافق مناسب با ارزیابی دستی: $HBM = ۱۲۰-۱۴۰$; $AREA = ۴-۶ \mu m^2$	بهینه‌سازی تشخیص سر اسپرم و برآورد غلظت و تحرک
۱۷ [®] ISAS	نرخ فریم موردنیاز در تصویربرداری پرسرعت پژوهشی	ثابت اولیه: ۵۰۰ fps نرخ برآورده شده برای رسیدن به ۹۵٪ مقدار مجانی: ۴۳۳,۷۲-۴۳۹,۶۷ ۹۵٪ بسته به نژاد	برای تحلیل دقیق حرکت‌شناسی، به‌ویژه VCL، در تصویربرداری پرسرعت. این مقادیر برای مطالعات پژوهشی‌اند و تنظیم معمول بالینی محسوب نمی‌شوند.

این سامانه‌ها نباید بدون اعتبارسنجی مستقل، کنترل دما و استفاده از محفظه شمارش مناسب، جایگزین سامانه‌های آزمایشگاهی اعتبارسنجی شده شوند. کاربرد منطقی آن‌ها غربالگری اولیه و تصمیم‌گیری مقدماتی است و نمونه‌های مرزی یا غیرطبیعی باید در شرایط استاندارد آزمایشگاهی تأیید شوند.

جهت‌گیری‌های آینده

پیشرفت آینده CASA در سگ باید از افزایش صرف تعداد متغیرهای اندازه‌گیری‌شده به سمت افزایش ارزش زیستی و بالینی داده‌ها حرکت کند. نخست، مطالعات چندمرکزی با پروتکل‌های مشترک و گزارش کامل تنظیمات برای ایجاد دامنه‌های مرجع قابل‌مقایسه ضروری است. دوم، پیامد اصلی مطالعات آینده باید شامل شاخص‌هایی مانند آبستنی، زایمان و تعداد تولد زنده باشد، نه فقط ارتباط با آزمون‌های آزمایشگاهی دیگر. سوم، متغیرهای مربوط به ماده، زمان تخمک‌گذاری، محل تلقیح و دوز اسپرم باید در مدل‌های پیش‌بینی وارد شوند.

تصویربرداری پرسرعت، ردیابی سه‌بعدی (Three-Dimensional Tracking)، میکروفلوئیدیک‌های (Microfluidics) شبیه‌سازی کننده محیط دستگاه تناسلی ماده و الگوریتم‌های هوش مصنوعی برای تفکیک اسپرم از ذرات زائد و پیش‌بینی عملکرد، مسیرهای امیدوارکننده آینده هستند (۲۶، ۵۲). با این حال، مدل‌های هوش مصنوعی باید با داده‌های متنوع از نژادها، محفظه شمارش‌ها و رقیق‌کننده‌های مختلف آموزش داده شوند و در مراکز مستقل اعتبارسنجی شوند؛ زیرا عملکرد بالا در داده‌های آموزشی داخلی الزاماً به کاربرد بالینی تعمیم نمی‌یابد.

تلفیق CASA با proAKAP4، پروتئومیک، ارزیابی سلامت DNA، فلوسایتومتری و تصویربرداری چندپارامتری بیضه می‌تواند به ایجاد یک «فنتیپ چندلایه باروری» کمک کند (۲۴، ۴۳). همچنین، تحلیل زیر جمعیت‌های اسپرم ممکن است نسبت به میانگین‌های ساده، اطلاعات بیشتری درباره تحمل انجماد و عملکرد بالقوه ارائه دهد (۳۱). با این حال، ارزش افزوده هر آزمون باید با مدل‌های پیش‌بینی و تحلیل هزینه - فایده ارزیابی شود.

با وجود این مزایا، تفسیر نتایج CASA با محدودیت‌های مهمی همراه است. نتایج این سامانه به شدت تحت تأثیر نوع دستگاه، نسخه نرم‌افزار، نرخ فریم، نوع و عمق محفظه شمارش، غلظت نمونه و نوع رقیق‌کننده قرار دارد و نبود استانداردهای یکسان، به‌ویژه نبود مقدار حدی‌های جهان‌شمول در سگ، همراه با تفاوت‌های نژادی و فردی، مقایسه مستقیم نتایج را دشوار می‌کند. همچنین، احتمال شناسایی اشتباه ذرات زائدها، سلول‌های غیر اسپرم، حباب‌ها و ذرات موجود در رقیق‌کننده‌هایی مانند زرده تخم‌مرغ به‌عنوان اسپرم، و نیز اختلال ردیابی در نمونه‌های با غلظت بالا، تجمع سلولی و برخورد اسپرم‌ها از دیگر منابع خطا هستند. در مقایسه با CASA-Mot، ارزیابی خودکار مورفولوژی پیچیده‌تر بوده و در برخی شرایط اعتبار کمتری دارد. علاوه بر این، CASA عمدتاً ویژگی‌های حرکتی اسپرم را اندازه‌گیری می‌کند و سنجش مستقیم توان لقاح را ارائه نمی‌دهد.

هزینه تجهیزات، نیاز به آموزش تخصصی، نگهداری دستگاه و اجرای برنامه‌های کنترل کیفیت نیز از محدودیت‌های کاربرد گسترده آن محسوب می‌شوند. در نهایت، خطر ایجاد دقت ظاهری بالا بدون افزایش ارزش زیستی یا بالینی باید مورد توجه قرار گیرد؛ زیرا افزایش تعداد متغیرهای گزارش‌شده یا افزایش تعداد ارقام اعشار، بدون اعتبارسنجی ارتباط آن‌ها با پیامدهای واقعی تولیدمثلی، الزاماً به بهبود ارزش بالینی منجر نمی‌شود. مرورهای تخصصی CASA نیز تأکید کرده‌اند که توان این فناوری در اندازه‌گیری دقیق حرکت اسپرم بسیار بیشتر از توان آن در پیش‌بینی مستقیم باروری است (۱۴، ۲۷، ۵۰).

سامانه‌های قابل حمل و کاربرد در محل

سامانه‌های مبتنی بر تلفن همراه و تبلت با هدف کاهش هزینه و فراهم کردن امکان ارزیابی در درمانگاه، مراکز پرورش یا محیط‌های تولیدمثلی توسعه یافته‌اند. مطالعات انجام‌شده با سامانه iSperm در سگ نشان داده‌اند که این ابزارها قابلیت اندازه‌گیری غلظت و تحرک را دارند و می‌توانند برای غربالگری مفید باشند؛ با این حال، میزان توافق آن‌ها با CASA آزمایشگاهی برای همه محدوده‌ها و پارامترها یکسان نیست (۱۰، ۵۲).

نتیجه‌گیری

CASA یکی از مهم‌ترین ابزارهای عینی برای توصیف حرکت اسپرم سگ است و در مقایسه نمونه‌ها، کنترل کیفیت، پژوهش‌های سردسازی و انجماد، ارزیابی اسپرم اپیدیدیمی، بررسی مداخلات درمانی و مطالعات سم‌شناسی ارزش بالایی دارد. این فناوری قادر است تغییراتی را آشکار کند که با ارزیابی چشمی قابل مشاهده نیستند و با تحلیل تعداد زیادی سلول، تکرارپذیری اندازه‌گیری را افزایش دهد. تفاوت CASA بین سگ‌های بارور و نابارور به معنی وجود یک آزمون قطعی باروری نیست؛ زیرا CASA تنها بخشی از کیفیت اسپرم را اندازه‌گیری می‌کند و باروری نهایی حاصل تعامل کیفیت اسپرم، تعداد اسپرم، سلامت ماده و مدیریت تلقیح است.

در کاربرد بالینی، بهترین رویکرد استفاده از CASA به‌عنوان جزء اصلی یک پنل چندپارامتری شامل تاریخچه و معاینه آندرولوژی، تعداد کل اسپرم متحرک، مورفولوژی، زنده‌مانی، سلامت غشا و آکروزوم و در موارد منتخب، بررسی DNA، عملکرد میتوکندری یا زیست‌نشانه‌ها است. تکرار نمونه‌گیری، گزارش کامل پروتکل و ارتباط دادن نتایج با پیامدهای واقعی تولیدمثلی، سه شرط اساسی برای تبدیل CASA از یک ابزار توصیفی قدرتمند به یک ابزار پیش‌آگهی معتبر در باروری سگ نه هستند.

منابع

- ۱- دست‌افکن برنتی سمیه. مقایسه اثر محافظتی افزودن زرده تخم گونه‌های مختلف پرندگان (مرغ، اردک و غاز) بر نگهداری اسپرم سگ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد [پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی]. مشهد: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ ۱۴۰۱.
- ۲- مهدی‌زاده امیر. اثر پنتوکسی‌فیلین بر ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی اسپرم سگ [پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی]. شهرکرد: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد؛ ۱۳۸۸.
- ۳- شریف‌زاده محمد. تأثیر نور قرمز بر کینتیک اسپرم گاو در روش شناورسازی روبه‌بالا (Swim-up)

[پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد]. تهران: پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری؛ ۱۳۹۸.

۴- صالح‌پور مرضیه. مقایسه طول تلومر و بیان ژن‌های مرتبط با آن (TRF1) و (TRF2) بین اسپرم‌های پرتحرک و کم‌تحرک سگ [پایان‌نامه دکتری دامپزشکی، گرایش ژنتیک فناوری‌های تولیدمثل]. شهرکرد: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد؛ ۱۴۰۱.

۵- حق‌پرست عباس. اثر پنتوکسی‌فیلین بر پارامترهای حرکتی اسپرم اپیدیدیمی قوچ در شرایط آزمایشگاه [پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی]. شهرکرد: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد؛ ۱۳۸۸.

6- Aires LPN, da Silva Alves DR, Gomes DR, da Câmara Barros FFP, de Oliveira Rodrigues V, Santos GS, et al. Exploratory associations between quantitative multiparametric testicular ultrasound and semen quality in dogs. *Theriogenology*. 2026;117929.

7- Arlt SP, Reichler IM, Herbel J, Schäfer-Somi S, Riege L, Leber J, et al. Diagnostic tests in canine andrology-What do they really tell us about fertility? *Theriogenology*. 2023;196:150-6.

8- Bencharif D, Belala R, Mimoune N, Le Couazer D, Farnia H. ProAKAP4 concentration in fresh canine semen and its correlation with motility parameters. *Veterinary and Animal Science*. 2025;28:100455.

9- Bernklau E, Wehrend A, Farshad A. Evaluation of Sperm Retrieval Efficiency and Extender Impact in Cryopreserved Canine Epididymal Semen. *Veterinary Sciences*. 2025;12(9):840.

10- Bulkeley E, Collins C, Foutouhi A, Gonzales K, Power H, Meyers S. Assessment of an iPad-based sperm motility analyzer for determination of canine sperm motility. *Translational Animal Science*. 2021;5.(۲)

11- Cassatella D, Martino NA, Valentini L, Guaricci AC, Cardone MF, Pizzi F, et al. Male infertility and copy number variants

- with Male Factor and Unexplained Infertility. *Med Arch*. 2016;70(1):39–43.
- 20- Iguer-Ouada M, Verstegen J. Evaluation of the “Hamilton Thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology*. 2001;55(3):733–49.
 - 21- Iguer-ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the “Hamilton Thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology*. 2001;55(3):733–49.
 - 22- Kil T, Kim M. Effects of different processed forms of Panax ginseng on sperm motility and reproductive parameters in male dogs. *Journal of animal science and technology*. 2025;67(3):701.
 - 23- Kustritz MR. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*. 2007;68(3):329–3v.
 - 24- Lea RG, Byers AS, Sumner RN, Rhind SM, Zhang Z, Freeman SL, et al. Environmental chemicals impact dog semen quality in vitro and may be associated with a temporal decline in sperm motility and increased cryptorchidism. *Scientific reports*. 2016;6(3):2811.
 - 25- Li Y, Lu T, Wu Z, Wang Z, Yu T, Wang H, et al. Trends in sperm quality by computer-assisted sperm analysis of 49,189 men during 2015–2021 in a fertility center from China. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;Volume 14 - 2023.
 - 26- Linde-Forsberg C, Ström Holst B, Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *Theriogenology*. 1999;52(1):11–23.
 - 27- Lu J-C, Huang Y-F, Lü N-Q. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia*. 2014;46(4):329–38.
 - 28- Lü N, Huang Y, Lu J. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia*. 2014;46(4):329–38.
 - 29- Maree L. Standard Semen Analysis: Computer-Assisted Semen Analysis. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A, editors. *Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction*. Cambridge: Cambridge University Press; 2021. p. 11–22.
 - (CNVs) in the dog: a two-pronged approach using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). *BMC genomics*. 2013;14(1):921.
 - 12- Christensen BW, Meyers S. Canine semen evaluation and processing. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2023;53(5):921–30.
 - 13- de Souza MB, England GC, Mota Filho AC, Ackermann CL, Sousa CVS, de Carvalho GG, et al. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. *Theriogenology*. 2015;84(5):805–10.
 - 14- Domain G, Banchi P, Ali Hassan H, Eilers A, Lannoo J, Wydooghe E, et al. Sperm gone smart: A portable device (iSperm®) to assess semen concentration and motility in dogs. *Animals*. 2022;12(5):652.
 - 15- Domosławska A, Zduńczyk S, Niżański W, Janowski T. Assessment of semen quality in infertile dogs using computer-assisted sperm analysis by the Hamilton-Thorne Semen Analyser. *Journal of Veterinary Research*. 2013;57(3):429–32.
 - 16- Dorado J, Rijsselaere T, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the Sperm Class Analyzer. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2011;57(6):318–25.
 - 17- Finelli R, Leisegang K, Tumallapalli S, Henkel R, Agarwal A. The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Transl Androl Urol*. 2019;8(3):306–10.
 - 18- Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Animal Reproduction Science*. 2012;135(1):97–105.
 - 19- Hajder M, Hajder E, Husic A. The Effects of Total Motile Sperm Count on Spontaneous Pregnancy Rate and Pregnancy After IUI Treatment in Couples



- 39- Schäfer-Somi S, Colombo M, Luvoni GC. Canine Spermatozoa—Predictability of Cryotolerance. *Animals*. 2022;12(6):733.
- 40- Sevilla F, Campos M, Araya-Zúñiga I, García-Molina A, Corcini C, Saborío-Montero A, et al. Defining optimal frame rate for kinematic semen analysis of different dog breeds assessed by computer-assisted sperm analysis. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2026;72:268–81.
- 41- Sevilla F, Campos M, Araya-Zúñiga I, García-Molina A, Corcini CD, Saborío-Montero A, et al. Defining optimal frame rate for kinematic semen analysis of different dog breeds assessed by computer-assisted sperm analysis. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2026;72(1):268–81.
- 42- Sicherle CC, Souza FFd, Freitas-Dell'Aqua CdP, Mothé GB, Padovani CR, Papa FO, et al. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. *Animal reproduction*. 2020;17(1):e20190081.
- 43- Siena G, Fontbonne A, Contiero B, Maenhoudt C, Robiteau G, Slimani S, et al. Stability over time of the sperm motility biomarker proAKAP4 in repeated dog ejaculates. *Animals*. 2025;15(8):1160.
- 44- Sinagra L, Polisca A, Donato G, Caspanello T, Pettina G, Pastore S, et al. Enhancing canine semen quality through a second centrifugation after 48 hours of storage: a comparative study. *Acta Vet Scand*. 2024;66(1):47.
- 45- Soler C, Cooper TG, Valverde A, Yániz JL. Afterword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology. *Asian J Androl*. 2016;18(6):895–7.
- 46- Strzeżek R, Fraser L. Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality. *Reproductive Biology*. 2009;9(2):113–26.
- 47- Tanga BM, Qamar AY, Raza S, Bang S, Fang X, Yoon K, et al. Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment—A
- 30- Mortimer ST, Van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian journal of andrology*. 2015;17(4):545–53.
- 31- Núñez-Martínez I, Moran J, Peña F. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *International journal of andrology*. 2007;30(3):182–9.
- 32- Núñez-Martínez I, Moran J, Peña F. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006;41(5):408–15.
- 33- Peña A, Johannisson A. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*. 1999;52(6):965–80.
- 34- Peña F, Núñez-Martínez I, Morán J. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006;41:21–9.
- 35- Rijsselaere T, Maes D, Hoflack G, De Kruif A, Van Soom A. Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser. *Reproduction in domestic animals*. 2007;42(2):143–8.
- 36- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*. 2003;60(8):1553–68.
- 37- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Nizanski W. Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: An update after 20 years. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012;47:204–7.
- 38- Schäfer-Somi S, Aurich C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Animal Reproduction Science*. 2007;102(1-2):1–13.



- review. *Animal bioscience*. 2021;34(8):1253.
- 48- Troisi A. Tecniche di prelievo e inseminazione artificiale nel cane. *Summa, Animali da Compagnia*. 2026;43(3):4.
- 49- Valverde A. CASA Systems Artifacts on Sperm Analysis for Artificial Insemination. *Andrology*. 2022;11:264.
- 50- Valverde A, Barquero V, Soler C. The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2020;29(3):189–98.
- 51- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002;57(1):149–59.
- 52- Yang L, Wei Q, Li W, Ge J, Zhao X, Ma B. C-type natriuretic peptide improved vitrified-warmed mouse cumulus oocyte complexes developmental competence. *Cryobiology*. 2016;72(2):161–4.
- 53- Yániz J, Silvestre M, Santolaria P, Soler C. CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*. 2018;30:799–809.
- 54- Yániz JL, Soler C, Santolaria P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Animal Reproduction Science*. 2015;156:1–12.





Application of Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) System in Dogs

Mohammad Soroush Entezari¹; Vahid Hamedianasl²;
Pezhman Mirshokraei^{3*}

1. Graduated DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.
2. PhD student in Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.

Received: 28 July 2026

Accepted: 12 September 2026

Summary

Accurate evaluation of male canine fertility is essential for determining breeding soundness, selecting stud dogs, diagnosing reproductive disorders, and planning artificial insemination. Despite its simplicity and widespread use, microscopic evaluation of sperm motility is subject to technician subjectivity, microscope optical quality, and sample-handling conditions, offering limited capacity to quantitatively describe the velocity and trajectory patterns of individual spermatozoa. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) systems identify sperm heads across sequential video frames and reconstruct their tracks, providing quantitative measurements of parameters such as total and progressive motility, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, and BCF. This review examines the operational principles of CASA, the technical and biological variables affecting its output, its clinical and research applications, and its prognostic value in canine fertility assessment. Evidence indicates that, following species-specific validation and rigorous standardization of variables—including temperature, extender formulation, sperm concentration, counting chamber design and depth, and frame capture rate—CASA serves as a rapid, objective, and reproducible tool for the quantitative analysis of sperm kinetics. CASA is extensively applied in comparing semen extenders, monitoring chilling and cryopreservation protocols, analyzing sperm kinematic subpopulations, evaluating epididymal spermatozoa, assessing nutritional interventions and toxicological effects, and integrating sperm kinetic data with testicular imaging. However, although specific CASA parameters differ between fertile and subfertile stud dogs, the system does not directly measure fertilizing capacity. Consequently, CASA-derived kinematic metrics must be interpreted in conjunction with a complete breeding history, genital tract examination, total motile sperm count, sperm morphology, membrane and acrosome integrity, and sperm DNA integrity.

Keywords: Male dog, Fertility, Sperm, Computer-assisted sperm analysis, Artificial insemination, Sperm cryopreservation

* Corresponding Author mirshokraei@um.ac.ir

