BREVI NOTE (*)

Modulatore per la trasmissione e la registrazione di segnali bioelettrici

Lo sviluppo dell'elettronica biomedica ha posto in primo piano i problemi di trasmissione a distanza e di registrazione di segnali biomedici.

Ciò si verifica sistematicamente ogni volta che i segnali prelevati da sensori impiantati su pazienti ricoverati in clinica devono essere elaborati da un calcolatore elettronico, in funzione on-line, situato ad una certa distanza dalla clinica e connesso ai sensori situati sul paziente mediante una linea telefonica, oppure quando il calcolatore è usato off-line ed i segnali devono essere registrati. Problemi simili si verificano anche nei casi di assistenza intensiva ed in particolare nei sistemi di telemisure.

I segnali elettrofisiologici o di natura biomedica in genere implicano bande di frequenze nettamente inferiori a quella interessata dalle frequenze udibili: ad esempio sono presenti frequenze dell'ordine di 0,1 Hz nel caso dell'elettrocardiografia, e frequenze ancora notevolmente più basse nel caso del ritmo respiratorio, delle pressioni intraluminali del sistema gastro-intestinale ecc.

I sistemi destinati alla trasmissione o alla registrazione di segnali di natura biomedica non possono quindi sfruttare le normali tecniche di telecomunicazioni e di registrazione di segnali audio, ma implicano la necessità di riprodurre frequenze bassissime, prossime alla continua.

Per tali motivi i segnali biomedici vengono generalmente trasmessi o registrati con sistemi di modulazione di frequenza audio, mediante MODEM o mediante opportuni modulatori incorporati nei registratori a nastro per usi biomedici, e successivamente rivelati con opportuni discriminatori [1].

Si è però ritenuto interessante studiare un modulatore che, pur essendo sufficientemente lineare in relazione agli errori accettabili nelle telemisure di carattere biomedico, fosse estremamente semplice, compatto e presentasse un ridotto consumo; in tal modo, il circuito studiato si presta bene per essere impiantato come elemento miniaturizzato sul paziente stesso, accanto al sensore. I dati così prelevati possono essere inviati via radio alla strumentazione esterna evitando così collegamenti a filo tra il paziente e la strumentazione.

Sono stati presi in considerazione vari circuiti in cui gli elementi di modulazione della frequenza erano diodi a capacità variabile inseriti in rete di oscillatori a sfasamento, a ponte di Wien e simili. Non essendo però la capacità del diodo un elemento variabile linearmente con la tensione, e data la limitata variazione percentuale della capacità, necessaria per una accettabile linearità, si è preferito utilizzare un circuito in cui si sfrutta la variazione di trasconduttanza di un transistor. Tale circuito deriva da uno precedente a tubi elettronici [2], ed è stato modificato per adattarlo alla realizzazione mediante semiconduttori.

(*) La Redazione non si ritiene responsabile delle opinioni espresse dagli Autori nelle Brevi Note.

Il circuito è mostrato in Fig. 1.

L'oscillatore è costituito dal transistor T_1 e dalla rete successiva di sfasamento a doppio T. Il transistor T_2 sostituisce il ramo trasversale resistivo del doppio T permettendo così la modulazione in frequenza dell'oscillatore.

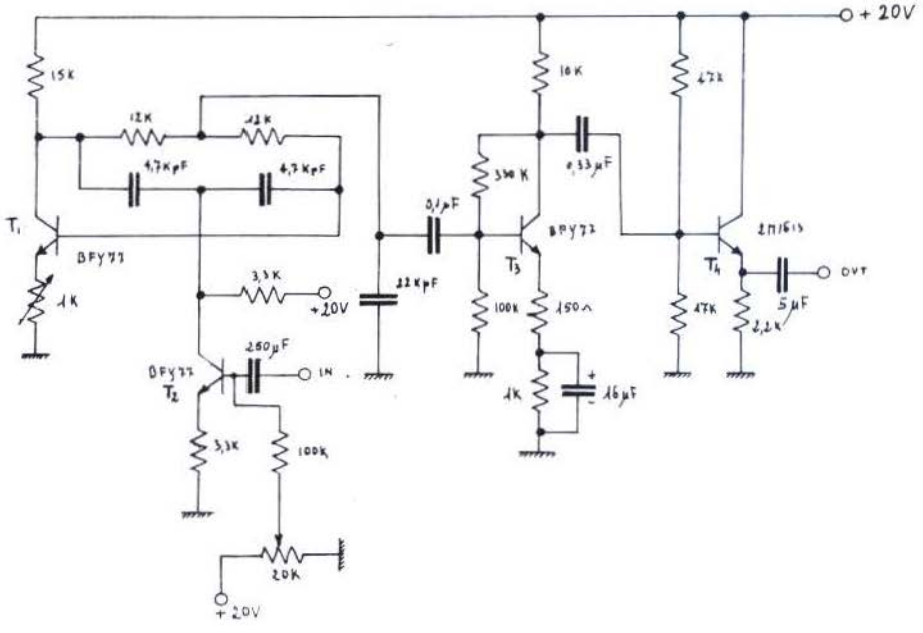

Fig. 1. — Schema elettrico del circuito descritto.

Il segnale modulato in frequenza viene quindi inviato tramite una capacità ad un amplificatore (transistor T_3) e quindi ad un emitter-follower (transistor T_4) in modo da avere un'uscita a bassa impedenza.

La frequenza ottenibile in funzione della tensione sulla base del transistor T_2 è riportata nel grafico di Fig. 2.

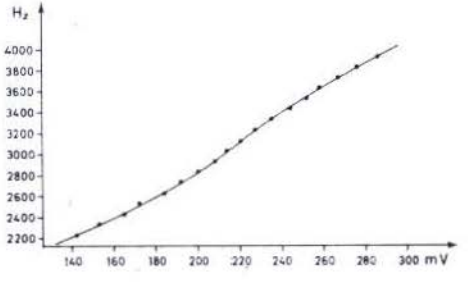

Fig. 2. — Andamento della frequenza del segnale di uscita in funzione della tensione d'ingresso.

L'impedenza di entrata è di 20 Kohm.

La banda di frequenza del segnale modulante, con le capacità di entrata e di uscita indicate, è compresa tra 0,1 e 100 Hz.

Il consumo totale è di 10 mA ed infine il peso totale con componenti miniaturizzati, esclusa l'alimentazione, è di 30-35 g.

Tengo a ringraziare il Prof. M. Frank e il Dr. V. Barbaro per gli utili-simi scambi di idee relativamente al presente lavoro.

Ricevuto il 29 dicembre 1970.

ARNALDO CASAGRANDE
Laboratori di Elettronica

BIBLIOGRAFIA

[1] BARBARO, V. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **7**, 86 (1971).

[2] MC GAUGHAN, H. S. & C. B. LESLIE. *Proc. I.R.E.*, **35**, 974 (1947).

Convertitore di tracciati in segnali elettrici

Introduzione

L'elaborazione di misure analogiche mediante calcolatore presuppone che queste siano disponibili sotto forma di segnali elettrici.

Talvolta, ancora oggi, i sistemi di acquisizione di dati prevedono una registrazione in forma grafica su nastro di carta per l'immediata visualizzazione del fenomeno e non prevedono contemporaneamente la registrazione degli stessi dati su nastro magnetico. Frequentemente, poi, è interessante eleborare delle informazioni registrate in passato e conservate sotto forma di tracciati; un tipico esempio è rappresentato dagli elettrocardiogrammi esistenti negli archivi delle cliniche e degli ospedali. Tali registrazioni si riferiscono a casi dei quali si conosce con sicurezza la diagnosi e costituirebbero una fonte preziosa di informazioni statistiche per lo studio delle cardiopatie, ai fini della diagnosi automatica.

Si è quindi ritenuto di notevole interesse lo studio e la realizzazione di un trasduttore che renda possibile l'introduzione di questi dati nel calcolatore, trasformando il segno grafico in segnale elettrico.

Il problema era già stato affrontato in passato con metodi di inseguimento manuale o automatico della traccia, ma i dispositivi realizzati presentano vari inconvenienti.

Nei trasduttori a inseguimento manuale la velocità è molto bassa e la precisione dipende esclusivamente dall'abilità e dall'attenzione dell'operatore.

Per i trasduttori a inseguimento automatico si hanno gravi problemi perchè la traccia può essere perduta se la pendenza del segno supera determinati limiti; inoltre un apparato capace di seguire tracce con forti pendenze è in generale meno preciso.

La maggior parte delle ricerche attualmente in corso è orientata sul rilevamento della traccia con metodi a scansione [1], utilizzando tubi flying-spot [2] o vidicon.

Per il presente sistema si è scelto il flying-spot per la scansione di riga e lo scorrimento meccanico del nastro, perchè tale metodo appare il più adatto per la lettura delle registrazioni in vista di un impiego su larga scala.

Descrizione del sistema

Lo schema di principio è illustrato in Fig. 1. Il fascetto di elettroni di un tubo a raggi catodici viene deflesso con andamento a dente di sega e il punto luminoso prodotto dalla eccitazione del fosforo effettua la scansione di una riga orizzontale. Tale riga viene proiettata mediante un obiettivo sul nastro di carta su cui è riportato il grafico. Il nastro poi si sposta verticalmente, in modo che viene esplorata tutta la registrazione.

Parte del flusso luminoso del nastro viene raccolto dal catodo di un fotomoltiplicatore che lo traduce in segnale elettrico corrispondente alla variazione di diffusione che si ha quando, durante la scansione, lo spot incontra il segno grafico.

Il tempo intercorso tra l'inizio della linea di scansione e l'istante in cui il punto luminoso proiettato sul nastro di carta attraversa il segno grafico è proporzionale all'ordinata della curva nel punto in esame.

La risoluzione del sistema [3] dipende dallo spessore del segno grafico, dal diametro e dalla velocità del punto luminoso e dalla persistenza del fosforo, naturalmente in relazione alla larghezza del nastro di carta.

Si è usato un oscilloscopio Tetronix 515 A, su cui è montato un tubo a raggi catodici con fosforo di tipo P 15.

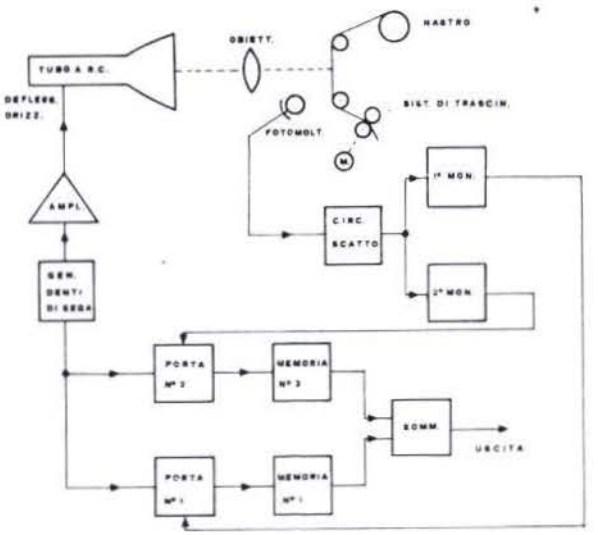

Fig. 1. — Schema di principio dell'apparecchio.

Con la frequenza di 1000 scansioni al secondo, con una lunghezza della linea di scansione di 5 cm, si ha una velocità lineare del punto luminoso sullo schermo di 50 m/s. L'allungamento del punto luminoso stesso, dovuto alla persistenza, è trascurabile [4].

Con questa velocità di scansione e con un avanzamento del nastro pari a quello con cui i segnali sono stati registrati, si può effettuare una campionatura di segnali contenente frequenze massime di 500 H_z senza perdita di informazione [5]. Poichè le registrazioni su carta di segnali biologici contengono una banda di frequenze comprese tra 0 e 100 H_z per i limiti intrinseci delle penne scriventi, si potrebbe far scorrere il nastro ad una velocità 4÷5 volte superiore a quella di registrazione e rendere il processo di trasduzione più spedito. In realtà si è trovato che il limite della velocità di lettura è dato dalle difficoltà meccaniche che si incontrano per far scorrere il nastro di carta a una velocità superiore a circa 20 cm/s.

Si è usato un obiettivo Wollensak da 75 mm, f/1:9 che consente una perfetta messa a fuoco del punto luminoso per tutta la linea di scansione.

Si è scelto il fotomoltiplicatore 1P28 per la curva di risposta che si adatta allo spettro di emissione del fosforo P 15.

Sistema di ricostruzione del segnale

Come abbiamo già visto, esiste una proporzionalità tra l'ordinata della curva da riprodurre e il tempo intercorso dall'inizio della linea di scansione all'istante in cui si ha l'impulso in uscita dal fotomoltiplicatore.

Il modo più semplice per passare da questa informazione all'effettiva ricostruzione della curva è quello di usare un convertitore tempo-ampiezza.

Si è utilizzato lo stesso segnale a dente di sega che comanda le placche di deflessione orizzontale del tubo a raggi catodici, che viene inviato a un circuito porta, normalmente interdetto.

In corrispondenza all'impulso di attraversamento della curva, che sblocca il circuito porta, si ha, all'uscita da questo, una tensione proporzionale all'ordinata della curva.

Questo valore viene conservato da un circuito di memoria del tipo «Sample and hold» fino all'impulso della successiva linea di scansione: si ha così una ricostruzione del segnale mediante un istogramma.

È stato notato [6] che con questo sistema si produce una distorsione del tracciato dipendente dal tempo di apertura del circuito porta, cioè dalla durata del segnale in uscita dal fotomoltiplicatore, in relazione al diametro dello spot ed allo spessore del segno grafico, specie se lo spessore è costante, come nel caso dei tracciati prodotti da penne a inchiostro formate da tubetti. Infatti le dimensioni dello spot e lo spessore del segno grafico producono un'allargamento del segnale elettrico prodotto dal fotomoltiplicatore e rendono la sua durata non trascurabile rispetto al periodo di scansione.

In altri termini, la funzione elettrica così ottenuta corrisponde all'inviluppo degli istogrammi inscritti al disotto della traccia, pertanto la funzione riproduce la traccia con un errore sistematico tanto maggiore quanto più grandi sono gli spessori del segno grafico e del diametro dello spot.

Per evitare l'inconveniente si è realizzato il circuito il cui sistema a blocchi è riportato in Fig. 1, circuito costituito da due canali di conversione tempo-ampiezza e di memoria. Come si vede dalla figura, il segnale del fotomoltiplicatore passa attraverso un circuito squadratore: si usano poi il fronte di salita e il fronte di discesa del segnale così

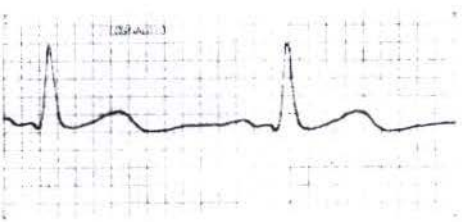

Fig. 2. — Tracciato elettrocardiografico.

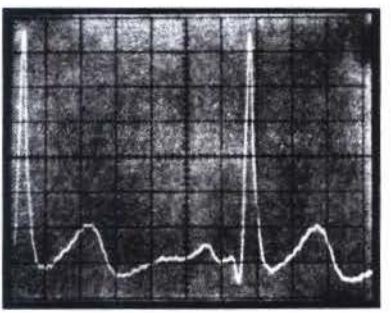

Fig. 3. — Oscillogramma della funzione elettrica corrispondente al tracciato di Fig. 2.

ottenuto per comandare due diversi monostabili dai quali si ottengono due impulsi molto stretti di durata costante e trascurabile rispetto al periodo di scansione. I due impulsi corrispondono al valore dell'ordinata delle curve rispettivamente sul bordo superiore e sul bordo inferiore del segno grafico.

Inviando i due impulsi a due diversi canali di conversione tempo-ampiezza e di memoria si ottengono due ricostruzioni analogiche, l'una per il bordo inferiore e l'altra per il bordo superiore del grafico da esaminare.

Le due ricostruzioni vengono inviate ad un circuito sommatore; in uscita da questo si ha un segnale analogico che corrisponde con buona approssimazione al valore dell'ordinata al centro del segno grafico e la precisione della ricostruzione è indipendente sia dalle dimensioni dello spot sia dallo spessore del segno grafico.

In Fig. 2 è riportato un tracciato ed in Fig. 3 l'oscillogramma della corrispondente funzione elettrica.

L'autore desidera esprimere al Prof. G. Francini ed ai suoi collaboratori, Prof. D. Fantuzzo e Ing. G. Clementi la sua gratitudine per le utili informazioni ed i preziosi consigli per la realizzazione del presente lavoro.

Tiene inoltre a ringraziare i tecnici S. Bedini, A. Casagrande, A. Corradini e M. De Angelis per la loro intelligente collaborazione.

Ricevuto l'8 giugno 1971.

MARCO CINI (*)

Laboratori di Elettronica

(*) Ospite dei Laboratori di Elettronica.

[1] BATTINI, E. *Alta Frequenza*, **32**, 521 (1968).

[2] FRANK, M. *Sistema di presa per la televisione. Corso di specializzazione in elettronica*. CNR (1965-66).

[3] BROWN, C. J. *Resolution of Flying Spot Sistems. IEEE Spectrum*. Vol. 18 (1967).

[4] WANG, S. *Solid State Electronics*. Mc. Graw-Hill, New York (1966).

[5] GILLE, J. C., M. J. PELLEGRIN & P. DECAULINE. *Feedback control system*. Mc Graw-Hill, New York, (1959).

[6] BARLOW, J. S. & R. A. DI PERNA. *IEEE Transaction in Biomedical Engeneering*. Gen. (1968).

Discriminatore a transistor per basse frequenze

1. – *Introduzione.*

In molti sistemi di comunicazione e strumentazione vengono impiegati segnali modulati in frequenza, con frequenza centrale molto bassa (V.L.F.), ed una deviazione relativa piuttosto ampia (fino a $\pm 40\,\%$), come nel caso della registrazione in FM su nastro magnetico o nei sistemi di telemetria multicanale o nella trasmissione su cavo telefonico di segnali a bassissima frequenza [1].

A causa della portante a bassa frequenza e della elevata deviazione relativa, il discriminatore differisce notevolmente da quelli usati per segnali RF; non si può sfruttare, ad esempio, la fase e l'impedenza di un circuito LC accordato, come nei discriminatori classici di Travis o di Foster-Seeley, essenzialmente per ragioni di stabilità termica.

Anche i metodi basati sul valore medio di un treno di impulsi di uguale area, generato internamente, la cui frequenza di ripetizione è uguale alla frequenza del segnale incognito, comportano la difficoltà di mantenere costante l'area degli impulsi per una variazione ampia di frequenza, conservando una sufficiente stabilità.

Il discriminatore qui descritto è stato progettato con lo scopo di ottenere un circuito facilmente accordabile, di facile allineamento e con una distorsione di linearità minore dell'$1\,\%$ per una deviazione di frequenza del $30\,\%$.

2. – *Principio di funzionamento.*

Da un segnale $\vec{v}$ modulato in frequenza, si ottengono due segnali $\vec{v}_1$ e $\vec{v}_2$ della stessa ampiezza e di fase opposta. Inoltre, da una rete di sfasamento passa-tutto si ottiene un terzo segnale $\vec{v}_3$ della stessa frequenza dei precedenti, e la cui fase $\varphi(\omega)$ relativa a $\vec{v}_1$ varia da 0° a 180°, quando la frequenza passa da zero a infinito, mentre l'ampiezza rimane costante. Questo segnale $\vec{v}_3$ è sommato separatamente a $\vec{v}_1$ e $\vec{v}_2$; i vettori somma vengono rivelati con un rivelatore di picco e quindi sottratti.

Dal diagramma vettoriale di Fig. 1*a* si vede che, in corrispondenza alla frequenza per cui $\vec{v}_3$ è in quadratura con $\vec{v}_1$ e $\vec{v}_2$, i segnali somma $\vec{v}_{2,3}$ e $\vec{v}_{1,3}$ hanno la stessa ampiezza, e quindi la loro differenza è nulla. Ciò definisce la frequenza centrale del discriminatore.

Per frequenze diverse da quella centrale, (Fig. 1*b*) i segnali $\vec{v}_{2,3}$ e $\vec{v}_{1,3}$ hanno una ampiezza diversa, per cui la loro differenza non è più nulla e l'ampiezza di tale segnale dipende dalla fase di $\vec{v}_3$ rispetto a $\vec{v}_1$, e quindi dallo scostamento rispetto alla frequenza centrale.

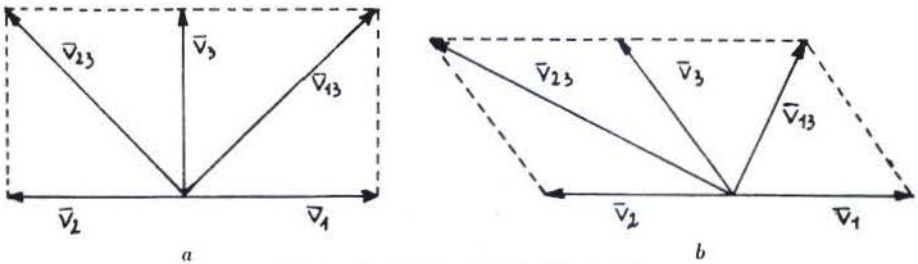

Fig. 1. — Diagramma vettoriale delle tensioni.

In Fig. 2 è riportato lo schema a blocchi del discriminatore.

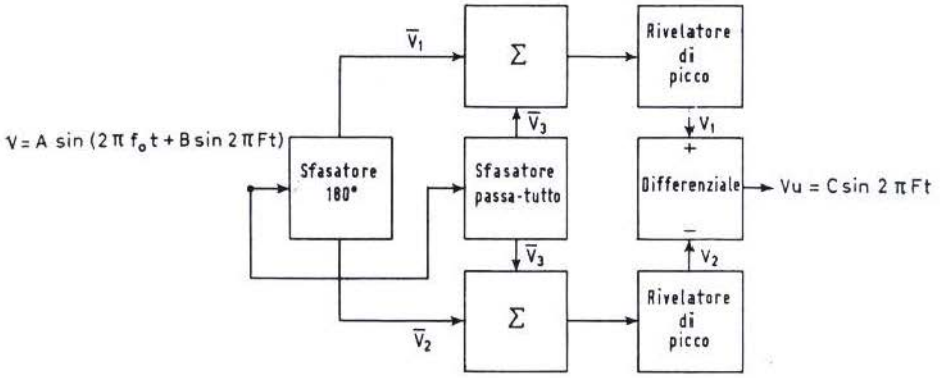

Fig. 2. — Schema a blocchi del discriminatore.

3. – *Sfasatore passa-tutto.*

Reti di sfasamento che hanno una caratteristica del tipo passa-tutto sono ottenibili con vari schemi [2,3]. È stata scelta la configurazione di Fig. 3 per la sua semplicità e facilità di accordo. Se le resistenze R_C ed R_E sono piccole rispetto ad R, e sono scelte in modo che il guadagno del circuito sia unitario, è valido il circuito equivalente di Fig. 3b la cui funzione di trasferimento è:

$$\frac{\vec{v}_3}{\vec{v}_i} = \frac{j x - 1}{j x + 1} \tag{3-1}$$

dove $x = 2 \pi f \tau$ e $\tau = R C$.

Come si vede, la (3-1) è la funzione di trasferimento di uno sfasatore puro, vale a dire il suo modulo è costante ed unitario e la sua fase varia tra $-\pi$ e 0 al variare della frequenza da 0 a infinito.

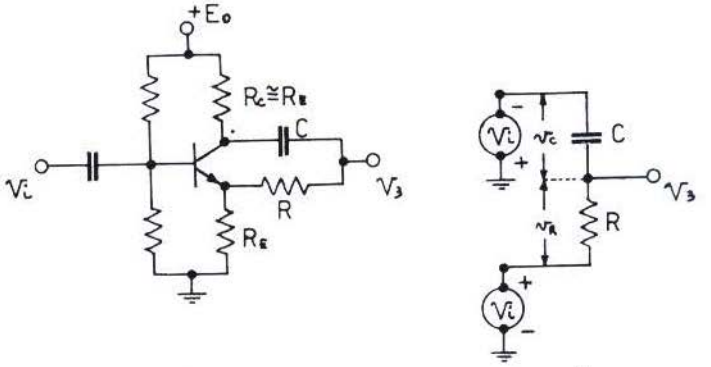

Fig. 3. — Sfasatore.
a) Schema circuitale. b) Schema equivalente.

4. – *Distorsione di linearità del discriminatore.*

Per poter fare delle considerazioni tecniche sulla linearità del discriminatore poniamo:

$$|\vec{v}_1| = |v_2| = V$$

$$|\vec{v}_3| = a V$$

e sia K l'efficienza dei rivelatori di picco.

Con riferimento alla Fig. 1 avremo:

$$\vec{v}_{1,3} = \vec{v}_1 + \vec{v}_3 = V + \alpha V \frac{jx-1}{jx+1} = \frac{(1-\alpha) + j(1+\alpha)x}{jx+1} V \tag{4-1}$$

$$\vec{v}_{2,3} = \vec{v}_2 + \vec{v}_3 = -V + \alpha V \frac{jx-1}{jx+1} = \frac{-V[(1+\alpha) + j(1-\alpha)x]}{jx+1} \tag{4-2}$$

All'uscita dei rivelatori di picco, tenendo conto delle (4-1) e (4-2) si avrà:

$$V_1 = K|\vec{v}_{1,3}| = KV\left[\frac{(1-\alpha)^2 + (1+\alpha)^2 x^2}{1+x^2}\right]^{\frac{1}{2}} \tag{4-3}$$

$$V_2 = K|\vec{v}_{2,3}| = KV\left[\frac{(1+\alpha)^2 + (1-\alpha)^2 x^2}{1+x^2}\right]^{\frac{1}{2}} \tag{4-4}$$

Per cui, dato che $V_u = V_1 - V_2$, dalle (4-3) e (4-4) si ottiene:

$$V_u = KV \frac{\left[(1-\alpha)^2 + (1+\alpha)^2 x^2\right]^{\frac{1}{2}} - \left[(1+\alpha)^2 + (1-\alpha)^2 x^2\right]^{\frac{1}{2}}}{(1+x^2)^{\frac{1}{2}}} \tag{4-5}$$

Definiamo coefficiente di distorsione di linearità della caratteristica del discriminatore il rapporto tra lo scostamento della caratteristica dalla tangente alla caratteristica stessa per la frequenza centrale ($x = 1, V_u = 0$) e la caratteristica stessa, cioè indicando con V_T la tangente:

$$N = \frac{V_u - V_T}{V_u} \tag{4-6}$$

Dalla (4-5) derivando e ponendo $x = 1$ si ottiene il coefficiente angolare di V_T che si può scrivere:

$$V_T = \frac{2KV}{(1+\alpha^2)^{\frac{1}{2}}}(1-x) \tag{4-7}$$

Dalle (4-5), (4-6) e (4-7) si ottiene quindi:

$$N = 1 - \frac{2\alpha(1-x)(1+x^2)^{\frac{1}{2}}}{(1+\alpha^2)^{\frac{1}{2}}\left\{\left[(1+\alpha)^2 + (1-\alpha)^2 x^2\right]^{\frac{1}{2}} - \left[(1-\alpha)^2 + (1+\alpha)^2 x^2\right]^{\frac{1}{2}}\right\}} \tag{4-8}$$

Derivando la (4-8) si vede che si ha un minimo per $\alpha = 1$ e che per una deviazione di frequenza del 30 % si ha una distorsione di linearità del 7,5 %.

Per ottenere un miglioramento nella linearità poniamo quindi $\alpha = 1$ e supponiamo di attenuare una uscita dei rivelatori di picco di un fattore γ. Si ottiene quindi dalle (4-3), (4-4):

$$V'_u = \gamma V_1 - V_2 = 2KV \frac{\gamma - X}{(1+x^2)^{\frac{1}{2}}} \tag{4-9a}$$

La frequenza centrale del discriminatore (V'_u)' quindi, resta definitita come: $f_o = \gamma/2\pi RC$. Esprimendo la (4-9a) in funzione della frequenza normalizzata $\nu = f/f_o$ si ha:

$$V'_u = 2KV\gamma \frac{1-\nu}{(1+\gamma^2\nu)^{\frac{1}{2}}} \tag{4-9b}$$

Sotto queste nuove condizioni si ottiene per N la seguente espressione:

$$N = 1 - \left(\frac{1+\gamma^2\nu^2}{1+\gamma^2}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{4-10}$$

Nella Tab. 1 sono riportati i valori di N per diversi valori di γ e due valori di ν. Per avere una distorsione di linearità di circa l'1% occorre quindi scegliere un valore di $\gamma = 0.3$. Si possono ottenere distorsioni anche minori ma in tal caso occorre diminuire γ e quindi la sensibilità del discriminatore.

TABELLA 1

Valori del coefficiente di distorsione, al variare di γ e ν

γ	0.15	0.30	0.50	0.75	1.00	0.15	0.30	0.50	0.75	1.00
ν	0.85					1.15				
N %	0.3	1.1	2.8	5.1	7.2	0.3	1.3	3.1	5.6	7.7

5. – *Circuito adottato.*

Una realizzazione pratica dello schema a blocchi rappresentato in Fig. 2 è mostrata in Fig. 4. In questo caso particolare è stata prescelta una frequenza centrale di 6.750 Hz., in quanto il discriminatore è stato impiegato per la rivelazione di segnali proverienti da un nastro magnetico registrato in FM alla velocità di 3 3/4 i.p.s.

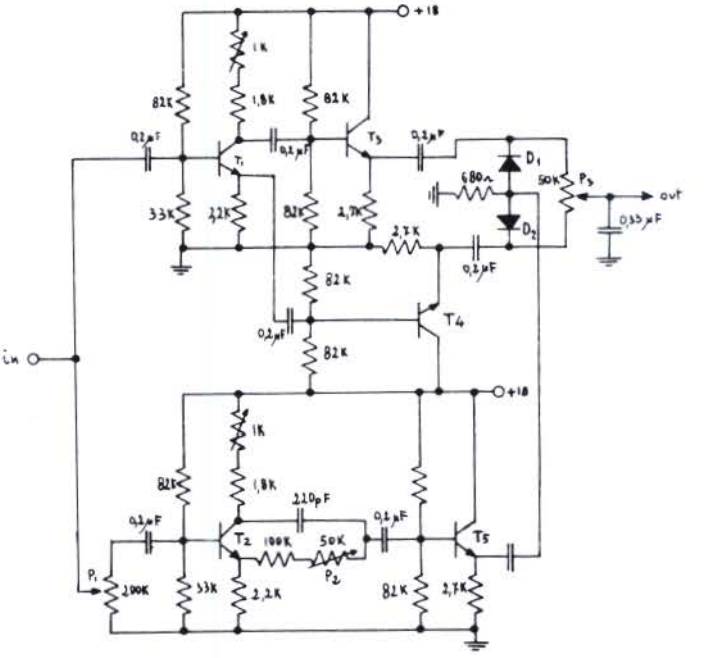

Fig. 4. — Schema circuitale completo del discriminatore.

Secondo gli standard in uso, la frequenza portante per tale velocità è appunto quella da noi usata. Variando i valori delle resistenze e del condensatore dello sfasatore, si possono ottenere frequenze centrali molto basse adatte all'impiego del discriminatore per la rivelazione di segnali modulati in frequenza che usano la rete telefonica come supporto.

Le due tensioni $\vec{v}_1$ e $\vec{v}_2$ sono ricavate dall'emettitore e dal collettore del transistor T_1. Il transistor T_2 permette nello stesso modo di T_1 di ottenere le tensioni per l'alimentazione della rete di sfasamento R_1, R_2, C alla cui uscita si ha la tensione $\vec{v}_3$. Gli stadi rappresentati

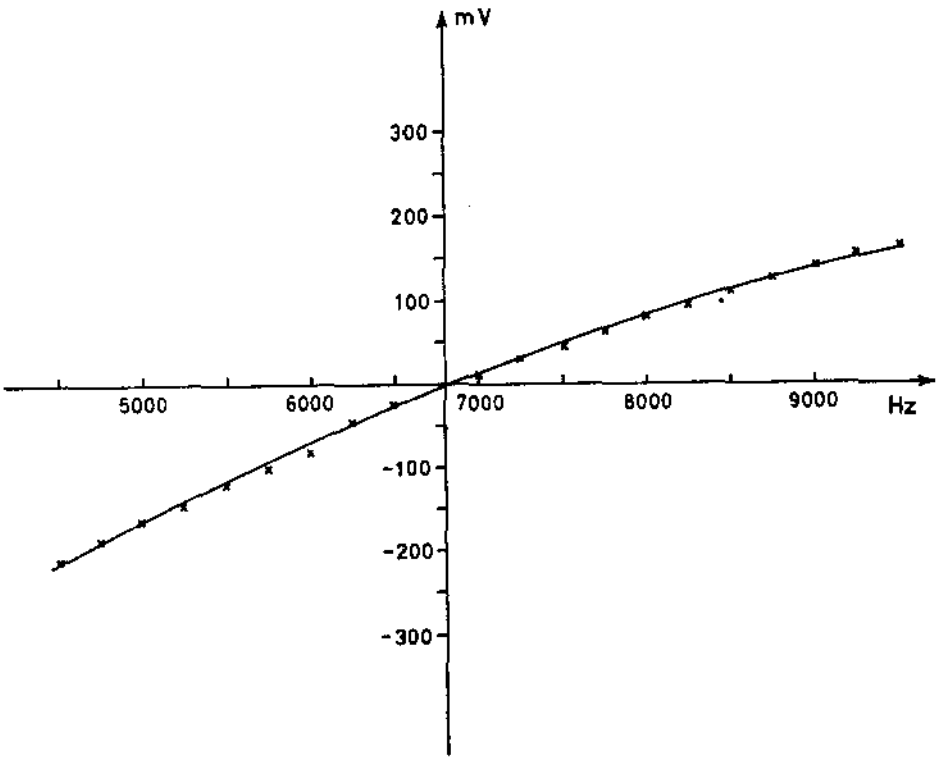

Fig. 5. — Caratteristica tensione - frequenza del discriminatore.

da T_3, T_4, T_5, sono dei separatori che alimentano a bassa impedenza il rivelatore che segue, formato da D_1 e D_2. Il potenziometro P_1 regola la sensibilità e, assieme a P_3, la linearità, mentre il potenziometro P_2 fissa la frequenza centrale del discriminatore.

In Fig. 5 è tracciata la caratteristica del discriminatore rilevata sperimentalmente.

Si ringrazia il tecnico Arnaldo Casagrande, che ha validamente contribuito alla realizzazione dell'apparato descritto nel presente lavoro.

Ricevuto il 24 febbraio 1971.

VINCENZO BARBARO

Laboratori di Elettronica

[1] CACERES, C. A. *Biomedical Telemetry*, Acad. Press, New York and London, 1965.

[2] REICH, H. J. *Functional circuits and oscillators*, Princeton (N. J.), D. Van Nostrand, 1961.

[3] KORN, G. A. *Basic Tables in electrical engineering*, Mc Graw-Hill Book Company, N. Y. 1965.

Isolation and systematic study of the first Bulgarian strains of saprophytic leptospiras

In October 1969 one of us isolated the first 12 strains of saprophytic leptospiras from water specimens taken in the ricefields of the villages Scutare and Costievo (region of Plovdiv, Bulgaria). The strains were isolated in pure culture by filtering a small quantity of water through a millipore filter with a porosity of 0.2 mμ and by seeding the filtered material in Korthof-Kmety's medium. In every case we repeated the filtration in order to eliminate completely the other microbes.

The isolated strains were able to grow in Korthof-Kmety's medium with 2-3% rabbit serum. They showed a plentiful and rapid growth after 2-3 day incubation at a temperature of about 20°C. The strains showed a resistance to Cu+ (growth in medium containing $CuSO_4$ 1:100000) and were able to grow in a medium added with 8-azoguanine and in the Mazzonelli's bicarbonate medium, as it is usual with saprophytic strains.

In order to ascertain whether the isolated strains were really pure and not a mixture of different leptospiras, we used the technical procedure already described by Babudieri [1]. After 6 successive transfers in the same batch of medium we tried to study the antigenic relationship of these strains, by testing them with the immune sera against the following pathogenic serotypes: pomona, bataviae, grippotyphosa, mini, icterohaemorrhagiae, bulgarica, mitis, australis. We were not able to detect any antigenic relationship.

The systematic study of these strains was carried out by preparing the corresponding immune sera from rabbits and by checking the strains among themselves by cross-agglutination tests. The results obtained are reported in Table 1.

Cross-absorption tests proved that strain Bulgaria 5 corresponds to strain Bulgaria 7 and that strains Bulgaria 6, 8, 10, 11, 13, 14 all belong to the same serotype.

According to these results the isolated strains con be assembled into 5 different groups, represented by the strains: Bulgaria 4, 5, 6, 12, 16.

These reference strains were compared, by cross-agglutination tests, with the reference strains of all the serotypes of saprophytic strains described till now, and more precisely: semaranga, patoc, São Paulo, monvalerio, andamana, bovedo, cau, doberdò, rupino, aurisina, farneti, percedol, basovizza, sangiusto, botanica, monfiascone, khoshamian, acquamarcia, tevere, holland, Roma, tredici.

Strains Bulgaria 4, 6, 16 did not show antigenic relationship with any of these strains; on the contrary, strain Bulgaria 5 reacted with strain Khoshamian and strain Bulgaria 12 with strain San Giusto. The results of the cross-absorption tests between these two couples of strains are reported in Tables 2 and 3.

TABLE 1

Cross-agglutination test among the Bulgarian leptospira strains

Antisera \ Strains	4	5	7	6	8	9	10	11	13	14	12	16
4	1:12800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	1: 3200	1: 3200	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	1: 6400	1:12800	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	1: 6400	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1: 6400	1: 1600	—	—
8	—	—	—	1:12800	1:25600	1:12800	1:25600	1:12800	1:25600	1: 6400	—	—
10	—	—	—	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1: 6400	1: 6400	1: 3200	1: 6400	—	—
11	—	—	—	1: 1600	1: 1600	1: 1600	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1: 1600	—	—
13	—	—	—	1: 3200	1: 3200	1: 1600	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1: 3200	—	—
14	—	—	—	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1: 3200	1: 800	1: 3200	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1: 3200	—
16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:25600

TABLE 2

Cross-absorption test between strains N. 5 and Khoshamian

Antiserum	Titre against 1 :		Absorbed with strain	Strain 5	Khoshamian
Khoshamian	10000	Khoshamian	N. 5	1 : 10	< 1 : 10
	5000	N. 5			
Against N. 5	5000	N. 5	Khoshamian	1 : 10	< 1 : 10
	10000	Khoshamian			

TABLE 3

Cross-absorption test between strains N. 12 and San Giusto

Antiserum	Titre 1 :	Absorbed with strain	Titre against strain	
			12	San Giusto
Against 12	3200	12	0	0
	1600	San Giusto	0	0
San Giusto	6400	12	0	0
	6400	San Giusto	0	0

0 = 3 % of the titre.

On the ground of all these results strain Bulgaria 5 is identical to the Iranian strain Khoshamian, belonging to the serotype khoshamian [1], and strain Bulgaria 12 is identical to the Italian strain San Giusto, belonging to the serotype sangiusto [2]. The remaining strains can be grouped into three new serotypes and serogroups, for which the following names are proposed:

Serogroups	*Serotypes*	*Representative strain*
Thracia	thracia	Bulgaria 4
Pulpudeva	pulpudeva	Bulgaria 6
Maritza	maritza	Bulgaria 16

Our study presents two points of main interest: 1) the isolation in Bulgaria of the same serotype (pulpudeva) from many specimens of water, collected in different sereas; 2) the isolation of three strains belonging to two serotypes (khoshamian and sangiusto), described until now in countries like Italy and Iran, very far from Bulgaria. Particularly interesting is the circumstance that a strain belonging to the serotype sangiusto was isolated also in Iran [2].

These findings give further confirmation to the statement that also for the complex «biflexa», serotypes constitute a reliable taxon, similarly to that of parasitic leptospiras, which keeps its antigenic pattern unchanged and can be present in different countries so far away from each other, without any obvious connection.

Received February 27, 1971.

IVAN IVANOV (*) and BRENNO BABUDIERI

Department of Microbiology

(*) Guest of the Department of Microbiology.

[1] BABUDIERI, B. *Bull. World Health Organ.*, **39**, 939 (1968).

[2] BABUDIERI, B. *Arch. Inst. Razi*, **21**, 17 (1969).

[3] CINCO, M. & N. PETELIN. *Trop. Geograph. Med.*, **22**, 237 (1970).