

Brugsvandsinstallationer og *Legionella*

Delrapport 1:

Lokale influensparametre for *Legionella* i brugsvandsinstallationer

- Influens fra temperatur, strømningsforhold, vandtryk, vandkvalitet mv.

INDHOLD:

Forord

Resumé og konklusion / Summary and Conclusion

Indholdsfortegnelse, detaljeret

1 Indledning til projektet og til del 1

2 Vand, biofilm og *Legionella*

3 Temperaturen betydning for *Legionella*

4 Vandstrømnings og vandtryks betydning for *Legionella*

5 Desinfektion ved temperatur- og biocidbehandling

6 Tapstedets betydning for *Legionella*

7 Samlet vurdering af lokale influensparametre

Referencer

Begreber og forkortelser

Teknologisk Institut

November 2022



FORORD

EUDP-projektet J. nr. 64020-1099 "Legionellasikring af energieffektivisering for installationer og forsyning" er dokumenteret ved 6 faglige delrapporter, jf. [EUDP2020-projekt 'Legionellasikring af energieffektivisering for installationer og forsyning' - Projekter - Teknologisk Institut](#)

Nærværende delrapport 1 har Søren Uldum og Ditte Andreasen Søborg som hovedforfattere af afsnit 2 og 3.1-3.2, og med Leon Buhl, Kaj Bryder og Henrik Kjeldsen som hovedforfattere for de øvrige afsnit. Udover disse har tillige den samlede projektgruppe medvirket ved udarbejdelsen.

Projektgruppen har bestået af:

- Hagbard Clausen (Lars Overgaard frem til juni 2021), DCW
- Torben Schifter-Holm, Metro Therm
- Søren Anker Uldum, Statens Serum Institut (SSI)
- Ditte Andreasen Søborg, VIA University College
- Carl Hellmers, Fredericia Fjernvarme
- Nikas Arp-Wilhjelm (Brian Kaarsberg frem til september 2021), KAB
- Tommy Steen Møller, Projektkontoret - Region Sjælland
- Leon Buhl, Henrik Kjeldsen og Kaj Bryder (projektleder), Teknologisk Institut (projektansvarlig).

Særlige skriveregler:

- *Legionella* er, af hensyn til formens generelle anvendelse i forskningsverdenen, benyttet som skrivemåde for Legionella/legionella i selve rapporterne
- Citerede afsnit fra kilder – evt. i oversættelse, er i teksten markeret enten i "" eller ved *kursivskrift*.
- Rapporteringen er opdelt i delrapporter (del 1, del 2 etc.), afsnit (1, 2, 3 etc.) og i underafsnit (2.1, 2.2 etc.). Desuden kan være yderligere opdeling ved fed skrift samt understregning, der også benyttes til markering af særlige ord/sentenser.
- Under projektarbejdet er gennemført en omfattende kildesøgning via litteraturl databaser, Google og andre kilder. Henvisning til tekstkilder er i teksten angivet ved [] indeholdende årstal og hovedforfatter/udgiver og henviser til referenceoversigten bagerst i rapporten. Ved henvisning til produktkataloger, hjemmesider mv. er alternativt anført hyperlink i selve teksten og med præcisering af kilden
- Figurer og tabeller er nummereret fortløbende inden for hvert afsnit, dvs. fx figur 3-1, 3-2 etc.
- Punktangivelser er generelt anført ved "•", mens henvisning til særlige kilder, geografiske områder mv. er markeret med "■". Oprensninger fremgår ved "-".

RESUMÉ OG KONKLUSION

EUDP-projektet J. nr. 64020-1099 ”Legionellasikring af energieffektivisering for installationer og forsyning”, der vedrører legionellasikring for brugsvandsinstallationer, omfatter bl.a. tre udredningsrapporter del 1 – 3.

Delrapport 1 omfatter en generel introduktion til projektet og dets rapportering samt en udredning vedr. de forskningsmæssige undersøgelser og resultater, som er blevet gennemført med henblik på at opnå større indsigt i og forståelse for tilstedeværelsen af *Legionella* i brugsvandsinstallationen.

Del 1 skal ses i sammenhæng med del 2, der dækker den geografisk fordelte incidens og dens mulige årsager, og del 3, der vedrører myndighedskrav og F&U-undersøgelser vedr. brugsvandsinstallationer, *Legionella* og energiforhold.

På baggrund af del 1-udredningen er projektgruppen kommet frem til følgende konklusioner:

- Den mest udbredte og for mennesker farligste legionellaart ifm. brugsvandsinstallationer er *Legionella pneumophila*. Da den vurderes at være årsag til over 90 % af de danske tilfælde af legionærsygdom (legionellapneumoni), har den i det videre arbejde fået hovedfokus.
- *Legionella* vokser især i brugsvandssystemets biofilmlag, hvor den ligger forholdsvis godt beskyttet.
- Der findes flere forskellige metoder til bestemmelse af *Legionella* i vandprøver, men de har typisk en svartid på flere dage. Arbejdet med in-line-metoder, dvs. hvor man via lab-on-a-chip måler *Legionella* direkte i rør, beholdere mv. og med hurtig respons, synes aktuelt at være gået noget i stå.
- Der er stor enighed om, at *Legionella pneumophila* udvikler sig ved temperaturer over 20 °C og under 50 °C. Derimod er der bl.a. pga. biofilmdannelse betydelig usikkerhed, når det gælder de temperaturer, der skal til for at reducere *Legionella* – og hvor lang tid temperaturerne skal være til stede. Dette spiller ind ved de såkaldte temperaturgymnastik-programmer, som ofte benyttes i praksis.
- Hvis vandtemperaturer for hele installationen er på 50 °C og derover, peger målinger på, at installationen normalt vil kunne holde sig inden for en anbefaling på maks. 1000 CFU/L. Ved en vandtemperatur på 55 °C og derover er sandsynligheden for dyrkbare *Legionella* meget lille.
- Kan brugsvandstemperaturen ikke generelt holdes på ovennævnte mindsteværdier, må der ske en kompensering og en desinfektion, som tager højde for biofilmdannelsen. Her vurderes den simuleringsmodel, som Gents Universitet arbejder med, som et af de mest interessante værktøjer ifm. konkret vurdering af temperatur- og strømningsforhold.
- De nyeste udredte sammenhænge mellem temperatur og *Legionella* peger på, at specielt temperaturkravene ved temperaturgymnastik må øges, så der tages hensyn til biofilm.
- For at opnå desinfektion af *Legionella* kræves en temperatur på 65 – 70 °C eller mere. Dette er udfordrende pga. mulig skoldning ved åbning af tapsted, men yderligere er det i Danmark særdeles uheldigt for rørens renholdelse pga. det høje kalkindhold i vandet.
- Der findes flere alternativer til temperaturdesinfektion, bl.a. tilsætning af biocid. Her er der pga. projektets sigte især fokus på anvendelse af hypoklorsyre, som ikke tidligere har været anvendt i så stor udstrækning, men som de seneste år har fået betydeligt mere fokus pga. dets umiddelbart mindre miljøbelastning.

- Også strømningsforholdene betyder meget for legionelladannelse, og naturligvis er døde ender en særlig udfordring, men dokumentation for hvilken vandhastighed og udskiftning, der skal til, er yderst sparsomt belyst via laboratorietest og ofte med lidt modstridende resultater.
- For både temperaturdesinfektion og desinfektion med biocid peges der generelt på, at det er vigtigt at kunne dokumentere effekten helt ud til tapstedet.

Projektgruppen vurderer, at det fundamentale dokumentationsgrundlag for fastlæggelse af influensparametrene, deres sammenhæng og deres usikkerhed generelt er svagt med henblik på at kunne udnytte det i en egentlig statistisk baseret risikovurdering.

SUMMARY AND CONCLUSION

The EUDP project J. no. 64020-1099 "Legionellasikring af energieffektivisering for installationer og forsyning", which concerns *Legionella* protection for domestic water installations, includes among other things, three investigation reports, parts 1 – 3.

Part 1 includes a general introduction to the project and the reporting as well as an investigation into the research studies and results that were carried out in order to gain a greater insight into and understanding of the presence and growth of *Legionella* in the domestic hot water installations.

Part 1 is related to part 2 which covers the geographically distributed incidence and the possible causes, and to part 3, which covers authority requirements and R&D studies of domestic water installations, *Legionella* and energy related matters.

Based on the investigation in part 1, the project group drew the following conclusions:

- The most widespread and most dangerous species of *Legionella* in domestic hot water installations is *Legionella pneumophila*. As this is estimated to cause more than 90% of the Danish cases of Legionnaires' Disease (*Legionella pneumonia*), it was mainly focused on in the further work.
- *Legionella* grows especially in the biofilm layer of the drinking water system, where it is relatively well protected.
- There are several different methods for determining *Legionella* in water samples, but typically they have a response time of several days. The work with in-line methods, i.e. where, via lab-on-a-chip, *Legionella* is measured directly in pipes, containers, etc. and with a fast response time, it seems that something has come to a standstill at the moment.
- It is generally agreed that *Legionella pneumophila* develops at temperatures higher than 20 °C and lower than 50 °C. On the other hand, due to e.g. biofilm formation, there is a considerable uncertainty when it comes to the temperatures required for the reduction of *Legionella* – and for how long the temperatures must be present. This is relevant for the so-called temperature gymnastics programs that are often used in practice.
- If the water temperatures for the total installation are kept at 50 °C and higher, the measurements indicate that the installation will normally be able to stay within the recommended max. 1000 CFU/L. At a water temperature of 55 °C and higher, the risk of *Legionella* is very low.

- If the service water temperature cannot generally be kept at the above-mentioned minimum values, a compensation and a disinfection must be carried out taking biofilm formation into account. The simulation model that Ghent University is working on, is assessed as one of the most promising tools for specific assessment of temperature and flow conditions.
- The most recently investigated correlations between temperature and *Legionella* point to the fact that especially the temperature requirements for temperature gymnastics must be increased in order to take biofilm into account.
- Temperature disinfection requires a temperature of 65 – 70 °C or more to ensure the reduction of *Legionella*. This is challenging due to potential scalding when opening the tap, and furthermore, in Denmark, it is particularly unfavorable for the cleanliness of the pipes due to the high lime content in the water.
- There are several alternatives to temperature disinfection, including addition of biocide. Due to the aim of the project, there is a particular focus on the use of hypochlorous acid, which was not previously used to such a large extent, but in recent years it has become more relevant because of its lower environmental impact.
- The flow conditions are also very important, and of course a specific challenge is dead ends, but documentation of the required water speed and water replacement is extremely sparsely elucidated through laboratory tests and often with conflicting results.
- For both temperature disinfection and disinfection with biocides, the importance of being able to document the effect all the way to the tap point is generally emphasized.

The project group assesses that the fundamental documentation basis for determining the influence parameters, their correlation and their uncertainty is generally weak with a view to being utilised in an actual statistically based risk assessment.

DETALJERET INDHOLDSFORTEGNELSE DEL 1

1 INDLEDNING VEDR. PROJEKTETS FORMÅL OG RAPPORTERING INKL. DEL 1...	6
1.1 Projektets formål og opdeling i delaktiviteter og -rapporter	
1.2 Delrapport 1 om de forskellige influensparametres betydning og samspil	
1.3 Del 1 – 3 udredningens anvendelse ved risikovurdering og produktløsninger	
2 VAND, BIOFILM OG LEGIONELLA	9
2.1 Vand, biofilm og værtsorganismer for <i>Legionella</i>	
2.2 <i>Legionella</i> og legionellaarter samt måling af <i>Legionella</i>	
2.3 Metoder for måling af <i>Legionella</i>	
2.4 Vandkvalitetens – inkl. vandets pH og materialeoverfladens betydning	
2.5 Risiko for legionella-smitte og sygdom	
3 TEMPERATURENS BETYDNING FOR LEGIONELLA	20
3.1 Vandtemperaturens betydning for <i>Legionella</i>	
3.2 Temperaturområder med markante variationer i legionellavækst og -død	
3.3 Fastlæggelse af kurveforløb for temperatur, tid og legionellavækst/-død	
3.4 Udvikling af simuleringsmodel under hensyntagen til biofilm	
4 VANDSTRØMNINGENS OG -TRYKKETS BETYDNING FOR LEGIONELLA	32
4.1 Vandets strømningsforhold (flow, vandudskiftning, dimension mv.)	
4.2 Stagnation og ”døde ender”	
4.3 Røroverfladens betydning for <i>Legionella</i> og biofilm	
4.4 Vandets trykforhold og dets betydning	
5 DESINFEKTION VED TEMPERATUR- OG BIOCIDBEHANDLING	34
5.1 Forskellige desinfektionsmuligheder	
5.2 Temperaturgymnastik	
5.3 Desinfektion med biocid	
6 TAPSTEDETS BETYDNING FOR LEGIONELLA	40
6.1 Armatortyper	
5.3 Anvendelse af biocid, ultralyd mv. for bekæmpelse og som forebyggende	
7 SAMLET VURDERING AF LOKALE INFLUENSPARAMETRE	41
7.1 Kompliceret sammenhæng mellem <i>Legionella</i> i installationen og legionærsygdom	
7.2 Legionellamåling besværlig og tidskrævende og ikke udsigt til on-site-metoder	
7.3 Temperaturen og strømningsforholdene som de umiddelbart mest betydende parametre	
7.4 Simuleringsmodeller kan på sigt øge indsigten i temperaturens og flowets betydning	
7.5 Resulterende temperaturbegrænsninger	
7.6 Desinfektion med biocid i form af bl.a. hypoklorsyre	
7.7 Input til det videre arbejde	
REFERENCER	44
BEGREBER OG FORKORTELSER	48

1 INDLEDNING VEDR. PROJEKTETS FORMÅL OG RAPPORTERING INKL. DEL 1

1,1 Projektets formål og opdeling i delaktiviteter og -rapporter

Projektet "Legionellasikring af energieffektivisering for installationer og forsyning" (EUDP J. nr. 64020-1099) gennemføres i perioden september 2020 til ultimo februar 2023.

Projektets fokus er på brugsvandsinstallationer, og formålet er at sikre installationer, som giver en lille risiko for *Legionella* iht. myndighedsforskrifter og vurderinger, og som samtidig tager hensyn til de energi- og klimamæssige udfordringer. Dette sker gennem:

- at udrede grundlaget for – og at udvikle et risikovurderingsværktøj for *Legionella* i brugsvandsinstallationer, samt at belyse en given indsats mod *Legionella* med konsekvenserne for energi, klima og miljø.
- at udvikle og demonstrere to kommercielle produktløsninger for legionellasikring gennem hhv. anvendelse af temperatur og biocid samt at sammenholde den opnåede legionellasikring med de udfordringer, det bevirker for energi, klima og miljø.

Projektarbejdet er opdelt i en række arbejdsopgaver og aktiviteter, samt dokumenteres i følgende 6 delrapporter (dele):

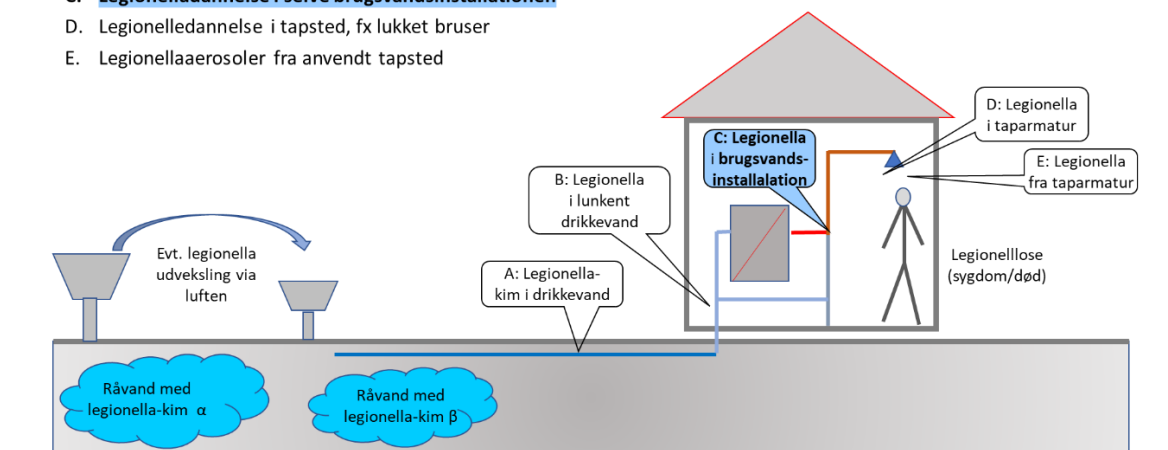
1. *Lokale influensparametre for Legionella i brugsvandsinstallationer*, der omhandler de forskellige influensparametre og deres specifikke betydning for udvikling af *Legionella*
2. *Incidens af legionærsygdom og mulig geografisk influens*, der belyser den geografisk fordelte incidens og undersøger mulige årsager til den meget betydelige danske variation.
3. *Myndighedskrav samt undersøgelser*, der udreder myndighedskrav, anvisninger, vejledninger og F&U-undersøgelser med fokus på brugsvandsinstallationer, *Legionella* og energiforhold. Endvidere sammenfattes resultaterne med input fra del 1 og 2 og med henblik på anvendelse i del 4 – 6.
4. *Legionella-risikovurderinger og -ressourcekonsekvenser*, der omhandler udvikling af et værktøj for vurdering af risiko for *Legionella* i brugsvandsinstallationer og belyser konsekvenser for energi, klima, miljø og økonomi, samt sammenfatter forbedringspotentialer.
5. *Legionellabekæmpelse i brugsvand gennem temperaturbehandling*, der omhandler udvikling og demonstration af løsning for temperaturkontrol og styring.
6. *Legionellabekæmpelse i brugsvand ved anvendelse af biocid*, der omhandler udvikling og demonstration af en forbedret løsning for biociddosering.

Del 1 -3 belyser resultaterne af den gennemførte udredning vedr. *Legionella* i brugsvandsinstallationer, og danner baggrund for dels arbejdet med Legionella-risikovurderinger og -energikonsekvenser i del 4, dels de to produktløsninger beskrevet i del 5 og 6.

1.2 Delrapport 1 om de forskellige influensparametres betydning og samspil

Legionella kan forekomme i grundvandet (A) og videre ud i drikkevandsforsyningen (B), men projektets hovedfokus er på brugsvandsinstallationen (C), hvor temperaturerne kan føre til legionellavækst, som så via tapstederne, fx en bruser, via aerosoler eventuelt kan blive inhaleret (F) og resultere i legionærsygdom, jf. illustrationen på figur 1-1.

- A. Legionella i drikkevandsforsyning
- B. Legionelladannelse i lunken drikkevandsforsyning
- C. Legionelladannelse i selve brugsvandsinstallationen**
- D. Legionelldannelse i tapsted, fx lukket bruser
- E. Legionellaerosoler fra anvendt tapsted



Figur 1-1 *Legionella* kan forekomme i flere led men projektets fokus er på brugsvandsinstallationen.

Brugsvandsinstallationen er med sine beholdere, vekslere, fordelingsledninger, koblingsledninger mv. typisk arnestedet for legionellaudvikling, samtidig med at tapstederne via små lokale lagringer af vandet eller ved en uheldig udformning kan forstærke legionellaoverføring til personer.

Delrapport 1 omhandler resultaterne fra udredningen vedr. den tilgængelige, forskningsmæssige viden om de influensparametre, der har afgørende betydning for legionellasikring i brugsvandsinstallationer, og som i forskelligt omfang spiller ind på mulighederne for at udvikle/begrænse *Legionella*.

Afsnit 2 beskriver, hvorfor der kan dannes *Legionella* i en vandførende brugsvandsinstallation via biofilmen, og hvilke arter der kan forekomme, ligesom der er omtalt forskellige målemetoder for *Legionella*. Afsluttende er anført de sygdomme, som *Legionella* kan føre til.

Vandtemperaturen er den mest betydende influensparameter for *Legionella*, og såvel de i litteraturen hyppigt viste kurveforløb/sammenhænge mellem Legionellavækst/-reduktion, temperatur og tidsafhængighed, som nyere simuleringsmodeller er omtalt. Afsnit 4 omhandler strømningsforholdenes betydning, herunder "døde ender", mens afsnit 5 behandler forskellige former for desinfektion af brugsvandsinstallationer med *Legionella* og biofilm, og afsnit 6 omhandler tapstedernes særlige betydning for *Legionella*. Endelig er i afsnit 7 givet en samlet vurdering vedr. de lokale influensparametre.

1.3 Del 1 – 3 udredningens anvendelse ved risikovurdering og produktløsninger

Et væsentligt sigte med del 1, samt del 2 og 3, er som anført at udrede og afklare et samlet grundlag for de influensparametre, som via en detaljeret gennemgang og sammenholdelse med grænseværdier har betydning for risikoen for *Legionella* i en brugsvandsinstallation. Dette er illustreret i tabel 1-1 og indgår i det udviklede værktøj beskrevet i del 4, ligesom influensparametrene har betydning ift. de to udviklede produktløsninger beskrevet i hhv. del 5 og 6.

Influensparametre	Delrapporter med afsnitshenvisning				Kommentarer ang. risici
	Del 1	Del 2	Del 3	Del 4- bidrag	
Installationstypen		(6)	5	•	Installationens princip, opbygning og opvarmning (fjernvarme, varmepumper mv.), uden/med cirkulation, kompleksitet og indregulering
Materialer og isolering	2	(6)	5	•	Det der har berøring med vandet. Ruhed, organiske materialer mv. Isolering for varmt/koldt vandsledning
Vandkvaliteten og vandbehandling	2, 5, 7	4	5	•	Vandkvalitetens evt. betydning Evt. forebyggende vandbehandling med biocid eller andre alternativer
Vandtemperaturen og temperaturbehandling	3, 5, 7	5	5	•	Temperaturforholdene, samt evt. forebyggende temperaturbehandling/desinfektion
Vandets strømning og tryk	4		5	•	Vandhastighed, -udskiftning (døde ender) mv.
Kontrol og regulering	2, 7		5	•	Evt. forebyggende kontrol og regulering via online automatik eller manuelt
Tapsted	6	->	5	○	Har stor betydning for den afsluttende vej fra vand til menneske, men indgår ikke detaljeret i risikovurderingen

- Primære influensparametre ved risikovurdering for brugsvandsinstallationen
- Delvist medtaget i risikovurderingen

Tabel 1-1 Udredte konklusioner vedr. influensparametrene, der leder frem til risikovurderingen i del 4.

Ved fastlæggelse af risikomæssige grænseværdier kan samtidig indgå hensyntagen til særlige beboerforhold med øget risiko for at få legionærsygdom (fx syge/ældre på sygehuse og plejehjem, unge på kollegium eller hotelbeboere med hyppige brusebade og jævnlige nedlukninger), ligesom mulighederne for varsling af beboere fx via alarm og/eller forhindring af forbrug af varmt brugsvand ved overskridelser kan spille ind.

Endelig er sigtet at udrede alternative, mere overordnede kriterier for risikovurdering af en brugsvandsinstallation, bl.a. ud fra:

- Måling af legionellaforekomst og -type gennem prøvetagning – og efterfølgende sammenligning med grænseværdier og anbefalinger, herunder evt. under hensyntagen til geografisk placering.
- Kendskab til bygnings- og installationstype samt alder – og efterfølgende sammenligning med statistiske erfaringsdata fra gennemgang af bygningsmassen.

2 VAND, BIOFILM OG LEGIONELLA

2.1 Vand, biofilm og værtsorganismer for *Legionella*

Vand, biofilm og *Legionella* med den farligste *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*)

Tilstedeværelse af biofilm er en forudsætning for vækst af *Legionella*. *Legionella* er primært (fakultativt) intracellulære parasitter, så der skal være værtsorganismer (amøber, andre protozoer eller flercellede dyr) tilstede. Biofilmen har specielt betydning for protozoerne som fødekilde, *Legionella* er i sig selv kun sjældent biofilmdanner. *Legionella* kan dog formeres uden for værtsceller ved tilstedeværelse af et støttende mikromiljø [2002 Morton and Keevil], herunder tilstedeværelse af nødvendige næringsstoffer. Herudover kan *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), der hyppigst er årsag til legionærsygdom (se afsnit 2.2), og en række andre legionellaarter dyrkes på/i komplekse medier (ikke alle arter kan dyrkes på medier).

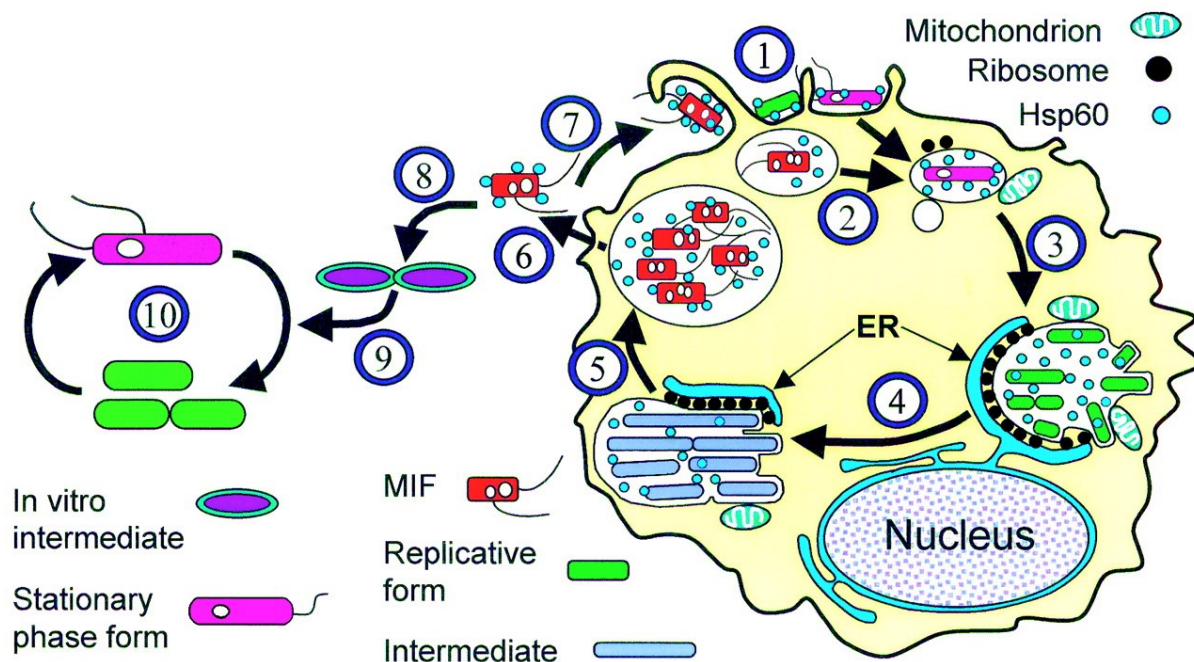
Legionella er antageligt kun smitsom efter intracellulær vækst i naturlige værtsceller, hvor de overgår til en Mature Infectious Form (MIF) [2002 Garduño] (figur 2-1). Denne MIF form har desuden øget resistens overfor antibiotika mv. herunder er den mere varme-tolerant end den dyrkede form. *Legionella* kan herudover forekomme i mange andre former alt efter vækstfaser og vækstbetingelser [2014 Robertson]. MIF-formen kan ikke skelnes efter dyrkning på substrat men kan have forskellige grader af resistens overfor varme, biocid mv.

VBNC (Vaible But Non-Culturable)-fasen med levende men ikke dyrkbar *Legionella*

En vigtig fase i strategien for overlevelse for *Legionella* er den såkaldte VBNC-fase, hvor de er levende men ikke dyrkbare (VBNC, Vaible But Non-Culturable). Denne fase er metabolisk inaktiv og kan induceres ved at udsætte cellerne for stress (varmebehandling, biocid, lav temperatur, UV-behandling, lavt næringsstof-niveau (fx ultrarent vand) mv.). VBNC-fasen udmærker sig ved at være meget lidt følsom for ydre påvirkninger herunder varmebehandling.

En undersøgelse med flow-cytometri viste at op mod 15% af en pladedyrket kultur fortsat var levende (ikke dyrkbare) efter 60 min. varmebehandling ved 70 °C. Af 12 undersøgte legionella-stammer var de, der havde bedst overlevelse, *L. pneumophila* serogruppe 1 (smitsom type), hvorfor varmebehandling (og biocidbehandling) eventuelt kan selektere for smitsomme typer [2008 Allega].

Forsøg med *Acanthamoeba castellanii* og en human monocyt (forstadie for makrofager mv.) linje (THP-1) har vist at langvarig behandling > 85 dage med vand ≥60 °C og 8 dage ved 70 °C helt kan eliminere både dyrkbare *Legionella* og *Legionella* i VBNC-fase [2019 Cervero-Aragó]. *Legionella* der er i VBNC-fase kan inficere værtsorganismer (også humane makrofager i laboratorieforsøg [2018 Dietersdorfer]) og efter den intracellulære vækst og livscyklus blive smitsomme (MIF). Det skal bemærkes at mange vækst og henfaldsforsøg med *L. pneumophila* er udført med celler i cyklus 10 (ekstracellulært *in vitro* dyrkede celler) i figur 2-1, som angiveligt generelt er mere varme- og biocidfølsomme end celler, der generelt er vokset naturligt.



Kilde: Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila* [2002Faulkner]

Det skal bemærkes at de forskellige stadier kan overgå til en VBNC-fase under stress, hvilket ikke er illustreret.

Figur 2-1. Simplificeret illustration af den intracellulære og ekstracellulære vækst-cyklus for *L. pneumophila*.

Biofilm er beskyttende for *Legionella*

En biofilm og den intracellulære vækst virker beskyttende for *Legionella*. Termisk- eller kemisk desinfektion skal derfor doseres afhængig af biofilmens tykkelse og densitet. *Legionella* kan desuden overleve i amøbecyster, der er meget resistente for biocider. Ved termisk desinfektion er det vigtigt, at den høje temperatur opnås i hele biofilmen (temperaturen bør måles på ydersiden af rørene). Ved kemisk desinfektion skal man vælge stoffer, der trænger ind i biofilmen (ikke blot stoffer der i vandfasen er cidale).

Des mere komplekst et vandsystem er, des højere risiko er der for at biofilm kan etableres og dermed for *Legionella*. Det er fx blandebatterier, vandspareforanstaltninger, blodgøringsanlæg, blandetanke, døde ender og mange tapsteder (specielt hvis de ikke alle bruges regelmæssigt), der kan danne baggrund for biofilmdannelse. Desuden bør det overvejes om etablering af alternativ opvarmning (sol, varmepumper og andet) kan udgøre en risiko. Rørarbejde på systemer kan efterfølgende give problemer ved at der frigives biofilm eller tilføres næringsstoffer.

2.2 *Legionella* og legionella-arter samt måling af *Legionella*

Legionella med forskellige legionellaarter og serogrupper

Bakterieslægten *Legionella* er små Gram-negative stave (rødlige iht. den farvemethode fastlagt af den danske læge Christian Gram), der optræder som parasitter i amøber og andre protozoer. De er almindelige i alle våde og fugtige miljøer, undtagen i saltvand. Der er i dag beskrevet 60 legionellaarter ([Genome List - Genome - NCBI \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/list)), men listen af ikke beskrevne arter er mindst lige så lang. Forskellige legionellaarter kan leve og formere sig under et meget bredt spektrum af miljøer (fra jord til vand) og ved temperaturer fra under 10 °C til over 50 °C.

EUDP Legionellasikring – Delrapport1: Lokale influensparametre for *Legionella*

L. pneumophila er en såkaldt mesofil bakterie og opformeres bedst ved temperaturer mellem 30 og 40 °C, og trives derfor ofte godt i de varmtvandssystemer, hvor temperaturen ikke holdes på et tilstrækkeligt højt niveau. Hvis temperaturen overstiger 48°C, kan *L. pneumophila* normalt ikke opformeres, og der ses en reduktion i bakterieantallet.

Legionella er årsag til to forskellige sygdomme hos mennesker - Legionærsygdom og Pontiac feber. Kun 25 af de kendte arter har været beskrevet som årsag til sygdom hos mennesker. Arten *L. pneumophila* er alene årsag til over 90 % af alle tilfælde af legionærsygdom, herefter følger arterne *L. micdadei*, *L. bozemanii* og *L. longbeachae* (som dog nogle steder (New-Zealand og Australien) er hyppig årsag til legionærsygdom). De øvrige arter er yderst sjældent årsag til human infektion.

L. pneumophila kan opdeles i 16 serogrupper, heraf er serogruppe 1 årsag til 50 - 60 % af alle infektioner i Danmark.

En undergruppe af serogruppe 1, "Pontiac", er specielt smitsom. De er årsag til langt de fleste serogruppe 1 infektioner globalt, men for patienter smittet i Danmark kun til ca. halvdelen af serogruppe 1 infektioner. "Pontiac" subgrupperne er generelt ikke særligt almindelige i miljøet, i varmtvandssystemer findes hyppigst *L. pneumophila* serogruppe 2 til 16, herefter følger serogruppe 1 non-"Pontiac" og sjældent serogruppe 1 "Pontiac". De øvrige arter påvises relativt sjældent (på nær *L. anisa*), men der er en underestimering ved dyrkning, som er optimeret til vækst af *L. pneumophila*. I virkeligheden er der *Legionella* i alle vandssystemer, nogle af de mere sjældne påviste arter kan godt være helt dominerende i specifikke varmtvandssystemer [2000 SSI].

De forskellige arter og typers typiske årsag til legionærsygdom og deres forekomst i Danmark fremgår af den efterfølgende tabel 2-1 [2016 SSI]. I tabellen er alle tilfælde diagnosticeret i Danmark medtaget, herunder rejseassocierede.

Forekomsten af dyrkbare *Legionella* målt i CFU/L

Forekomsten af dyrkbare *Legionella* måles i CFU/L, hvor CFU – Colony Forming Units – er et begreb fra mikrobiologien og er antallet af synlige kolonier på vækstsustrat (almindeligvis giver én bakterie ophav til én koloni, i nogle tilfælde kan det dog være flere bakterier, der giver ophav til en enkelt koloni).

CFU giver en indikation for mængden af levende mikroorganisme i en væske. Dette tal, bestemt ved at tælle de enkelte kolonier, beskriver antallet af organismeceller i vandet, som er i stand til at formere sig. De kolonidannende enheder er vigtige i mikrobiologien, for eksempel for at se udviklingen af en cellekultur, men også for at finde ud af hvor høj koncentrationen er i fx levnedsmidler, vandprøver og andre miljøprøver. Det anbefales ofte, at legionellakoncentrationen skal være mindre end 1000 CFU/L for at sikre en uproblematisk installation, jf. del 3.

Legionella art	Årsag til udbrud på verdensplan	Danmark
<i>L. pneumophila</i> serogruppe 1 Pontiac*	Årsag til alle større community udbrud, samt > 90 % rejse-associerede tilfælde. Raske personer kan blive smittet.	Sjældne i miljøet 40 - 50 % af alle tilfælde
<i>L. pneumophila</i> serogruppe 1 non-Pontiac# <i>L. pneumophila</i> serogruppe 3	Årsag til sporadiske tilfælde samt mindre community udbrud, få rejseassocierede tilfælde og sjældent større hospitalsudbrud.	Almindelige i miljøet 30 - 40 % af alle tilfælde
<i>L. pneumophila</i> andre serogrupper end serogruppe 1 og 3	Hovedsagelig årsag til sporadiske tilfælde blandt immunsvækkede, sjældent hospitalsudbrud.	Almindelige i miljøet ca. 10 % af alle tilfælde
<i>Legionella</i> non-pneumophila visse sygdomsfremkaldende arter fx <i>L. micdadei</i> og <i>L. bozemanii</i>	Sporadiske tilfælde blandt immunsvækkede, meget sjældent hospitalsudbrud.	Relativt sjældne i miljøet højest 5 % af alle tilfælde
<i>Legionella</i> non-pneumophila med meget lav virulens fx <i>L. anisa</i>	Meget få tilfælde på verdensplan.	Almindelige i miljøet - <i>L. anisa</i> er den hyppigst påviste non-pneumophila art i miljøet
Ikke virulente <i>Legionella</i> arter	Ingen tilfælde.	Almindelige i visse miljøer - fx køltårne. Vanskelige at dyrke

Tabellen giver et overblik over hvilke typer af *Legionella* der er skyld i hvilke udbrud og tilfælde. Den røde pil, indikere faldende smitsomhed, der er fx set et enkelt udbrud af rejseassocieret LD forårsaget af *L. pneumophila* serogruppe 5 - desuden gælder at mange af typerne kan give pontiac feber - fra *L. pneumophila* serogruppe 1 Pontiac til *L. anisa*.

* Pontiac (eller MAB 2/1 positive) omfatter subgrupperne Philadelphia, Benidorm, Knoxville og Allentown/France

Non-Pontiac (eller MAB 2/1 negative) omfatter subgrupperne Bellingham, OLDA/Oxford, Heysham og Camperdown

Smitterisiko beror på følgende forhold

- Koncentration af *Legionella* bakterier
- Type af *Legionella* bakterie - se ovenfor
- Spredningsgraden - aerosolisering
- Graden af eksponering (tid mv.)
- Antal personer der bliver eksponeret
- Modtageligheden (helbredsstatus) hos personer der bliver eksponeret

Kilde: "Legionellavejledning – risiko og tolkning af vandanalyser", SSI [2016 SSI]

Tabel 2-1 Legionella-arter og deres årsager til legionærsygdom blandt danske tilfælde.

Forekomsten af *Legionella* fundet via DNA (qPCR)

qPCR (kvantitativ polymerase kædereaktion) er en metode, som også er meget anvendt (men er kun i få lande en myndigheds-ankendt metode), hvormed man bestemmer antallet af genomenheder (GU) i en prøve. Der anvendes små specifikke DNA-sekvenser (primere og probe) for de/den pågældende bakterie, som man ønsker at undersøge for. Det kan gøres på familie-, slægts- og artsniveau eller for specifikke gener i en subpopulation. For *L. pneumophila* kan man fx påvise et gen, der er specifikt for serogruppe 1 (*wzm*) eller genet (*lag-1*), der er semi-specifikt for de mest smitsomme typer.

qPCR har ulemper og fordele i forhold til dyrkning. Ulempen hænger sammen med at døde bakterier (med DNA) kan påvises. Fordelen ved qPCR er, at metoden også påviser VBNC, samt at alle bakterier

EUDP Legionellasikring – Delrapport1: Lokale influensparametre for *Legionella*

kan påvises. I nogle tilfælde vil aggregerede celler (fx i en amøbe) kun give ophav til én CFU ved dyrkning. Herudover er metoden ikke følsom for konkurrerende vækst og kan påvise ikke dyrkbare arter. qPCR vil derfor generelt give et resultat, der viser et højere antal bakterier (i nogle tilfælde langt højere) end det, der påvises ved dyrkning. Dette har bidraget til at metoden har haft svært ved at blive anerkendt, da der ikke er helt overensstemmelse med resultater opnået med den anerkendte referencemetode (dyrkning).

2.3 Metoder for måling af *Legionella*

Efterfølgende er beskrevet en række metoder for måling af *Legionella*. Yderligere information om forskellige metoder kan bl.a. findes i "Confirming the Presence of *Legionella pneumophila* in Your Water System: A Review of Current *Legionella* Testing Methods" af Walker og McDermott [2021 Walker].

Metoder til påvisning af *Legionella* gennem kvantitativ dyrkning – Levende *Legionella*:

Standardiseret metode/r (DS/EN ISO 11731:2017): Analysetid 7 til 10 dage.

Metoden (som den udføres på SSI) opdeles i:

1. Vandprøver med højt bakterieindhold:
 - Direkte udsæd (2x 0,5 mL) og filtrering/udrustning (normalt anvendes 1 liter)
 - Detektionsgrænse for direkte udsæd er 1000 CFU/L – kvantificerbar ved > 5000 CFU/L (100% recovery)
 - Detektionsgrænse for filtrering og udrustning: 10 – 100 CFU/L (der er ikke 100% recovery)
2. Vandprøver med lavt bakterieindhold:
 - Direkte udsæd (2x 0,5 mL) og filtrering – filteret anbringes direkte på substratet (normalt anvendes 100 mL)
 - Detektionsgrænse: 10 CFU/L (100% recovery, dog afhængig af type/art)
3. Biofilm, slam og jord – Prøver fortyndes, varme/syrebehandles og udsås på selektivt medium
 - Detektionsgrænse kan ikke angives

Metoden påviser levende og dyrkbare legionellaarter. Kun arter med vækst under de givne omstændigheder (temperatur og substrat) påvises. Mange legionellaarter gror ikke eller dårligt under disse omstændigheder (*Legionella* har primært intracellulær vækst). Metoden påviser således primært *L. pneumophila*. Under visse forhold (fx efter en varme- eller biocid-behandling eller fra koldt vand eller vand med lavt næringsindhold) kan mange *Legionella* være i en levende men ikke dyrkbar fase (VBNC). *Legionella* i VBNC-fasen påvises således ikke ved dyrkning, men de kan overgå til en dyrkbar og smitsom fase efter passage i værtsceller (protozoer).

Legionella gror langsomt ekstracellulært, og derfor kan andre bakterier (der kan gro på de selektive substrater) med hurtigere vækst overvokse dyrkningssubstratet eller direkte hæmme væksten af *Legionella*. For at overkomme dette kan prøverne syre-behandles (pH 2.2) og/eller varmebehandles (50 °C), idet de fleste andre bakterier dræbes ved denne behandling, en del *Legionella* kan dog også dø ved denne behandling. Legionellaniveauet vil derfor ofte blive underestimeret i prøver med kraftig baggrundsvækst.

Ved dyrkning kan isolater/kolonier identificeres nærmere ved artsbestemmelse, sero-/subgruppe samt DNA-typebestemmelse. Dette giver mulighed for en nærmere risikovurdering i forhold til smitterisiko samt bruges ved smitteudredning, idet man kan sammenligne isolater fra patient og vand-/miljøprøver. Der findes mere end 16 serogrupper (16 er karakteriseret) af *L.pneumophila* og

syv subgrupper af *L. pneumophila* serogruppe 1 og over 3000 forskellige DNA-typer (Sekvens Typer). I Danmark har vi påvist alle serogruyper og subgrupper og mere end 150 forskellige sekvenstyper.

Andre metoder baseret på dyrkning

Legiolert / Quanti-Tray Legiolert:

[Quanti-Tray/Legiolert Procedure \(idexx.com\)](https://www.idexx.com/legiolert-procedure)

(Colorimetry og fluorimetry) (IDEXX laboratories)

Accepteret i henhold til NF T90-431 og NF EN ISO 11731

Metoden er et kommercielt produkt, der er uafhængig af filtrering og faste substrater. Der analyseres 100 mL som tilsættes en "kassette" med 93 brønde med flydende vækstsubstrat. Vækstsubstratet er et enzym/substrat system, som ved vækst af *L. pneumophila* giver en farveændring (brun farve). Prøven fortyndes i kassetten (i celler), således at antallet kan kvantificeres, i princippet ned til en celle pr. 100 mL (10 CFU/L).

Resultaterne kan aflæses visuelt ud fra et medfølgende skema, men kan også aflæses automatisk med *Legiolert/Quanti-Tray* ved kolorimetri.

- Detektionsgrænse: 10 CFU/L
- Påviser kun dyrkbare *L. pneumophila* (ikke andre arter eller VBNC)
- Påvirkes ikke af baggrundsflora
- Analysetid 7 dage

Metoden kræver ikke nærmere kendskab til mikrobiologi eller *Legionella*.

Skal de dyrkede bakterier nærmere typebestemmes, skal der udtages materiale fra positive celler, som sås tyndt ud på pladesubstrat, så man kan få enkeltkolonier.

Metoden har ved validering i forhold til ISO 11731 vist en noget bedre følsomhed (flere positive prøver og højere kolonital (CFU/L), se [2018 Spies]).

MICA *Legionella* by Diamidex:

<https://diamidex.com/legionella/>

Testen er baseret på en metabolisk inkorporation af et syntetisk suktermolekyle (DIAMIDEX pLeg-N₃) ved vækst af bakterierne. Ved brug af "click chemistry" kan cellerne (mikrokolonier) ses og tælles ved brug af fluorescens.

- Påvisning af mikrokolonier (kolonier på filter)
- Analysetid 48 timer
- Påviser levende – metabolisk aktive *L. pneumophila*
- Detektionsgrænse 100 CFU/L – afhængig af den volumen der undersøges.

Co-cultur med amøber:

Ved dyrkning sammen med amøber kan VBNC og flere legionellaarter, der ikke kan gro på substrater, påvises. Det er ikke en rutinetest og udføres kun i specialiserede laboratorier.

Metoder for fastlæggelse af *Legionella* via qPCR

Der findes flere forskellige kits fx. BIO-RAD (iQ-Check) <https://www.bio-rad.com/es-ec/product/iq-check-legionella-real-time-pcr-kits?ID=LS517MLPT> og PALL (GeneDisc) [2011 Lee]

<https://shop.pall.com/us/en/food-beverage/quality-control/environmental-monitoring/zidgri78y25>, samt mange in-house metoder:

EUDP Legionellasikring – Delrapport1: Lokale influensparametre for Legionella

- Udarbejdede standarder AFNOR T90-471 og ISO/TS 12869:2019
- Påviser *Legionella* spp., *L. pneumophila* og evt *L. pneumophila* serogruppe 1 (fx PALL)
- Påviser levende, VBNC og døde *Legionella* (døde celler, der har frigivet DNA påvises "ikke").
- Vandprøver og biofilm kan undersøges
- Detektionsgrænse: Afhængighed af hvor meget vand, der filtreres, og DNA-oprensningsmetode, generelt 200 til 1000 GU/L (5 til 10 GU pr. PCR-reaktion).
- Metoden er uafhængig af tilstedeværelse af baggrundsflora og vækstkrav for forskellige arter.

Der kan være god sammenhæng mellem dyrkning og qPCR for *L. pneumophila*. Der er dårlig sammenhæng mellem dyrkning og qPCR for *Legionella* spp.(non-*pneumophila*), idet der i mange prøver findes høje niveauer for *Legionella* spp. uden dette kan påvises ved dyrkning.

For systemer, der permanent eller periodisk er behandlet med høj varme/biocid, kan der være store forskelle på resultater for dyrkning af *L. pneumophila* og *L. pneumophila* påvist ved qPCR (som også påviser VBNC og døde *L. pneumophila*).

Nogle prøver kan indeholde stoffer der kan hæmme PCR-reaktionen, der således giver for lavt niveau eller ingen reaktion (hæmning kan påvises ved at inkludere en hæmningskontrol).

Analysetid med oprensning og koncentrering og DNA er få timer til 2 døgn (afhængig af hvor automatiseret det er).

Delvis typebestemmelse (*L. pneumophila* serogruppe 1 og non-serogruppe 1), men der er i princippet mange muligheder for typebestemmelse på de oprensede DNA.

qPCR kan udføres så kun "levende" eller intakte celler påvises ved at tilsætte et farvestof fx ethidium monoazide, der krydsbinder frit DNA og DNA i døde celler (stoffet kan trænge ind i døde skadede celler), og derved forhindres amplifikation af dette DNA. Disse metoder har endnu ikke rigtigt fundet indpas som rutinemetoder, da resultater har været variable.

Der findes andre metoder der kan påvise DNA/RNA end PCR, men de er ikke anvendt rutinemæssigt.

Metoder baseret på antistof/antigen reaktion

Metoderne kan have forskellige platforme, men er hovedsageligt Laterel Flow Assays og bygger på at påvise antigen (*L. pneumophila* LPS) ved hjælp af specifikke antistoffer.

Der findes flere forskellige kits på markedet, fx

file:///C:/Users/su/Downloads/Risk%20Assessment%20Kit%20Data%20Sheet7_19Lovibond_2.pdf:

- Påviser kun *L. pneumophila* serogruppe 1
- Ingen kvantificering (kan være semikvantitativ)
- Påviser både døde, VBNC og levende celler.
- Detektionsgrænse: 100 CFU/L med filtrering til 100.000 CFU/L uden filtrering
- Analysetid: Hurtige on-site test – ca. 25 min (med filtrering lidt længere)
- Kræver ikke laboratoriefaciliteter
- Biofilmprøver kan også undersøges
- Ingen typebestemmelse

Metoden kan ikke anvendes til egentlig risikovurdering, dels er kun få anlæg positive for serogruppe 1 (ca. 10 %), mens mange anlæg er positive for andre serogrupper (ca. 80%), dels forårsages ca. 40% af alle tilfælde af *Legionella* af andre serogrupper end serogruppe 1 (i Danmark).

Metoder for on site/in line fastlæggelse af *Legionella*

Med baggrund i det nuværende metodegrundlag for fastlæggelse af *Legionella* er det ikke så let at fastlægge en on site/in-line metode. Der findes for nærværende ikke ud fra projektgruppens research færdigudviklede og kommercielle kompakte sensorer for online fastlæggelse af *Legionella*.

Der blev under EU's H2020-rammeprogram i perioden 2015 – 2018 gennemført to forholdsvis store projekter, hhv. POSEIDON og CYTO-WATER, vedr. in-line/on-site-måling af *Legionella*.

POSEIDON havde til formål at udvikle en lab-on-chip metode baseret på lysmålinger. Der blev sigtet mod, at den nye bio-fotoniske, kompakte lyssensor skulle kunne detektere legionellabakterien på mindre end en time, dvs. som erstatning for en op til 10 dages normal dyrkning og analyse.

Projektnavnet "POSEIDON" står for "Plasmonic-based automated lab-on-chip Sensor for the rapid In-situ Detection Of Legionella", og projektet er omtalt i flere artikler og på hjemmesider med forventning om snarlig kommercialisering, se [2018 POSIEDON].

Aktuelt foreligger der dog ikke artikler eller andet, som belyser metodens og den udviklede sensors anvendelse i praksis. En henvendelse i marts 2022 til POSEIDON-projektets faglige projektleder Roberto Pierobon fra firmaet PROTO LAB SRL i Italien resulterede yderligere i oplysning om, at da nøglepersonen i udviklingstiltaget forlod projektet umiddelbart efter afslutningen i 2018, var den videre udvikling sat i bero og ikke genoptaget. Pierobon havde ikke kendskab til tilsvarende tiltag, men refererede i stedet til CYTO-WATER-projektet og et mindre, fransk tiltag kaldet C4Hydro.

I CYTO-WATER-projektet [2018 CYTO-WATER] er der baseret på forskellige teknologier opbygget en billeddannende cytometerplatform, der via suspendering af en vandprøve og strømning gennem en laserstråle, er i stand til at detektere små mængder af mikroorganismer i forurenede vand, herunder *Legionella*. Gennem test og validering baseret på kendt *Legionella* forventes en detekteringstid på under 2 timer. Cytometeret anføres at få en størrelse svarende til en smartphone, hvortil kommer prøveudtagningsdelen. Samlet virker det umiddelbart som et større, transportabelt udstyr, der retter sig mod større brugsvandsanlæg fx på hospitaler og vandtårne, og ikke som en indbygget, meget kompakt sensor, som det var tilsigtet i POSEIDON-projektet.

En henvendelse i marts 2022 til den tekniske direktør for projektet Vicente Catalan, fra Labaqua i Spanien angående en kommercialisering af udstyret bevirkede følgende tilbagemelding " *As you say in your Email, CYTO-WATER was a EU H2020 project and its goal was to develop a functional prototype for in-line monitoring of Legionella. Based on the market study we did, the investment needed in developing the prototype to a marketable product was not supported by the requirements of potential customers. Basically, most of the companies were looking for rapid technologies replacing regulatory gold standards methodologies (replacing conventional culture isolation by disruptive technologies) or using these rapid methods internally but without any CAPEX and the cost payed based on consumption. In consequence, we decided to stop the evolution of the device to a marketable product because the market was not ready following with the business model we had to follow*". Der er således heller ikke herfra forventninger om snarest at kunne tilbyde in-line-målinger.

Mht. det franske C4Hydro-tiltag, så er det fuldt kommercialiseret. Der tilbydes køb på nettet af mindre udstyr, der kan gennemføre test fra måling til resultat inden for 24 timer og med en detektionsgrænse på 10 CFU/L, jf. <https://shop.c4hydro.com/brouillon-auto/?lang=en>. Udstyret skulle basere sig på teknologi svarende til det anførte i Diamidex® technology 'click chemistry', se <https://diamidex.com/microbial-detection-solutions/legionella>, der dog anfører en samlet tid på 48

timer fra måling til resultat. Også firmaet C4Diagnostics tilbyder en tilsvarende diagnostisk metode, se [C4Legio LFA - C4Diagnostics](#). Generelt er der forventning om at 'click chemistry' vil finde øget indpas på mange områder indenfor diagnostik og miljøbiologi. Det er dog langt fra et on site/in line system, så mulighederne på dette felt ligger desværre et stykke ud i fremtiden.

2.4 Vandkvalitetens – inkl. vands pH samt materialeoverfladens betydning

Mikroorganismer kræver en række forskellige fysiske (fx temperatur, pH) og kemiske (fx ilt, kulstof) faktorer for vækst. For *Legionella* hænger bakteriens optimale vækstkrav sammen med dens parasitiske livsform i amøber og andre protozoer, der ofte er associeret med biofilm.

Biofilm reagerer hurtigt på miljøforandringer og således vil biofilmens struktur og sammensætning i fjernvarmesystemer også være et resultat af vandkvaliteten. Variationer i biofilmsammensætning kan drives af både fysiske, kemiske og hydrauliske faktorer. Således har både temperatur, flow og tryk, biofilmens alder [2003 Martiny], vandbehandlingsprocesser [2015 Proctor, 2018 Liu], desinfektionsmidler, rørmaterialer [2014 Wang] og sæsonvariationer [2017 Deuterelo] alle vist sig at have betydning for biofilmsammensætning.

Fysisk-kemiske faktorer karakteriserende vandkvaliteten, der formodes at have særlig betydning for biofilmsammensætningen og legionellaforekomst, inkluderer temperatur, pH, organisk stof, sporstoffer og hårdhed.

I vandsystemer vokser biofilm på indersiden af rørene. Derfor kan rørmaterialet have en stor betydning for biofilmens sammensætning og de interaktioner, der er mellem *Legionella*, værtsamøben og det generelle mikrobielle samfund i biofilmen. Rør- og fittingsmaterialer omfatter kobber, jern og forskellige typer plastik, der kan afgive uorganisk og organisk stof.

En grundig beskrivelse af forholdene angående dannelse af biofilm fremgår af phd-afhandlingen "Mikrobiologisk vandkvalitet i varmtvandsinstallationer" ved Lene Bagh [1998 Bagh].

Foruden temperatur, der har vist sig at have en afgørende betydning for vækst af *Legionella*, så er det ikke umiddelbart muligt at pege på specifikke vandkvalitetsparametre, der alene fremmer legionellaforekomst. Snarere er det samspillet mellem forskellige faktorer og den biofilmsammensætning, der findes i et givent system.

Emnet er yderligere belyst i del 2, afsnit 4, hvor en forklaring på den betydelige danske, geografiske variation i incidensen af legionærsygdom er søgt fundet med baggrund i undersøgelse af den danske vandkvalitet.

2.5 Risiko for legionellasmitte og -sygdom

Pontiac feber

Pontiac feber er en influenzalignede sygdom, der går over af sig selv uden behandling. Risikoen for sygdom er lige høj for alle uanset køn og alder. Ved udbrud er sygdomsraten meget høj (>90%) (alle bliver syge). Sygdommen kan antageligt forårsages af mange forskellige arter og typer af *Legionella*. Det er fortsat uklart hvornår *Legionella* forårsager Pontiac feber og hvornår legionærsygdom. Ved udbrud af Pontiac feber kan begge sygdomsformer optræde (mange med Pontiac feber og få med legionærsygdom). Antageligt opstår Pontiac feber ved indånding af høje koncentrationer af *L. pneumophila* som ikke er i MIF fase (men i stationær fase form (figur 2-1)) eller eventuelt af mindre smitsomme arter (fx *L. anisa* el. *L. micdadei*). Sygdommen er nærmere en immunologisk reaktion (som ligner endotoxin feber) på høje bakterieantal end en egentlig infektion. Man har dog både kunne påvise *Legionella* i luftvejssekret og som antigen i urin ved tilfælde af Pontiac feber. Der påvises kun meget få tilfælde af Pontiac feber i Danmark, men der har dog været udbrud.

Legionærsygdom

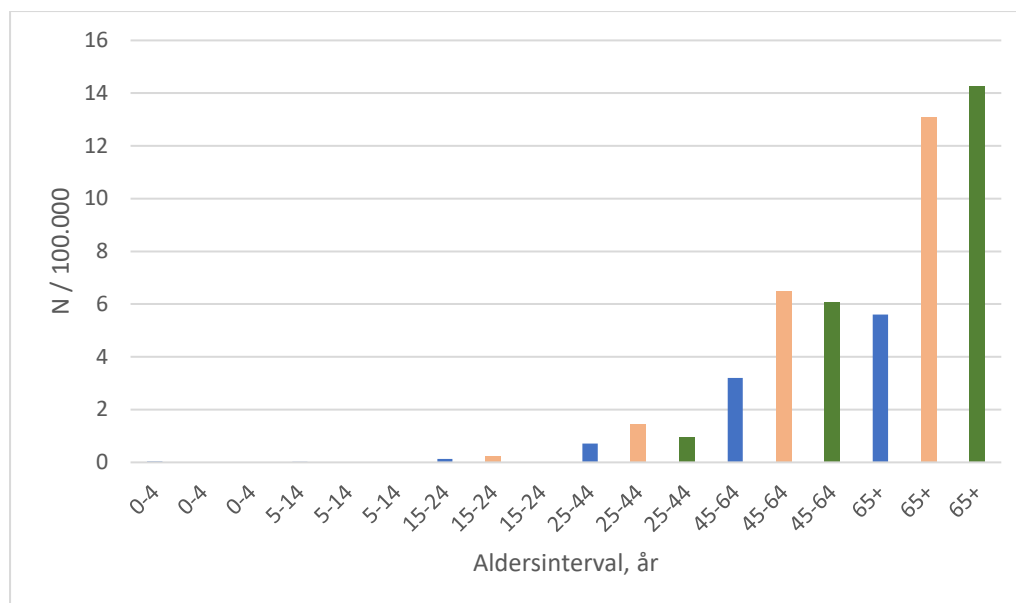
Legionærsygdom er en svær lungebetændelse med en mortalitetsrate på ca. 10%. Infektionen skyldes at alveolære makrofager (en type hvide blodceller i alveolerne) er meget lig amøber. Det er celler, der er vores første forsvar mod infektiøse agenser. Makrofagerne indfanger bakterierne og forsøger at fordøje/nedbryde dem, men som hos amøber kan *Legionella* undvige denne proces og i stedet etablere sig og dele sig i makrofagen. Udviklingen i makrofagen er dog ikke så komplet som i en amøbe, og bakterien udvikler ikke en helt udviklet MIF-fase, hvilket antageligt er årsagen til, at man ikke ser person til person smitte.

Risikofaktorer for at blive syg med legionærsygdom

Risikoen for at blive syg er størst hos mænd (1,3 til 2 gange større i forhold til kvinder, og 2 gange eller mere for rejseassocierede tilfælde). Den relative risiko stiger med alderen (figur 2-2).

I Danmark er denne aldersassociation specielt tydelig i forhold til gennemsnittet for EU/EEA, men dog ikke så forskellig fra aldersfordelingen for Italien, med omtrent samme registrerede incidens som i Danmarks (figur 2-2). Risiko for død stiger med alderen, således var mortalitetsraten for personer > 65 år 19% i 2020. Desuden stiger risikoen ved underliggende sygdom, primært for immunsupprimerede eller ved kronisk lungesygdom. Rygning og alkoholisme er desuden disponerende. Anslagsraten er lav, idet mindre end 5% af de personer, der udsættes for smitte, bliver syge (ved udbrud med mest smitsomme typer). Relativt i forhold til hvor ofte man eksponeres for *Legionella* med almindelige miljøtyper er smitsomheden dog meget lavere.

Generelt smitter *Legionella* ved indånding af forstøvet (aerosoliseret) vand, der er forurenet med *Legionella*. *Legionella* kan også smitte ved fejlsvælgning (aspiration) af kontamineret vand, dette ses specielt hos ældre og hos patientgrupper hvor fejlsvælgning er almindelig.



Kilde: Surveillance Atlas of Infectious Diseases; <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>

Figur 2-2 Aldersstandardiserede incidensrater for legionærsygdom 2019 i EU/EEA (blå), Italien (orange) og Danmark (grøn).

Jo højere koncentration des højere risiko for smitte. Der skal antageligt mindst være 10^4 CFU/L i kilden (vandfasen) for at udgøre en risiko [2012 Ricci; 2020 Management of *Legionella* in Water Systems], men det skal tages med forbehold og der er ikke konsensus om dette. Den smitsomme dosis afhænger af virulensen (smitsomheden) af den legionellatype, der er i vandsystemet, graden af aerosolisering og den udsatte persons modtagelighed. Man regner med at indånding af bare én amøbe inficeret med *Legionella* kan give årsag til sygdom (en amøbe kan indeholde op til ca. 1000 *L. pneumophila* celler [2012 Buse]).

Smitsomheden er forskellig alt efter hvilke *Legionella* der er i systemet: *L. pneumophila* serogruppe 1 "Pontiac" gruppen (*lag-1* positive) har højeste smitsomhed (risiko for udbrud/flere tilfælde), herefter følger *L. pneumophila* serogruppe 1 tilhørende non-"Pontiac" gruppen og herefter *L. pneumophila* tilhørende andre serogrupper [2002 Helbig]. *Legionella* tilhørende andre arter end *L. pneumophila* er sjældent årsag til sygdom, men det kan forekomme. Man regner med at andre arter er årsag til ca. 5% af alle tilfælde af legionærsygdom, men det er sandsynligvis et underestimat, da diagnosen er vanskelig at stille.

Ved en risikovurdering for et brugsvandsanlæg skal der også tages højde for, hvor mange og hvem der eksponeres. Risikoen for sygdom stiger med antallet af personer, der udsættes for smitekilden (fx svømmehaller (brusere) og hoteller), herudover er risikoen lav for børn (skoler) men høj for ældre (plejehjem) og immunsvækkede (hospitaller).

3 TEMPERATURENS BETYDNING FOR LEGIONELLA

3.1 Vandtemperaturens betydning for *Legionella*

Legionella har vækst-optimum omkring 30 – 40 °C

L. pneumophila har vækstopimum omkring 30-40°C (se efterfølgende tabel 3.1 og figur 3-2). Man må dog regne med, at nogle legionellatyper (stammer) kan vokse op til temperaturer på 45 °C og nok måske højere i sjældnere tilfælde og helt ned til 20°C. Ved temperaturer ≥ 48 °C vokser *L. pneumophila* ikke længere og begynder at dø [1999 Kusnetsov]. Selektion for thermo-tolerans (thermophili) og vækst af *L. pneumophila* ved temperaturer > 50 °C er påvist i et studie [2016 Lesnik].

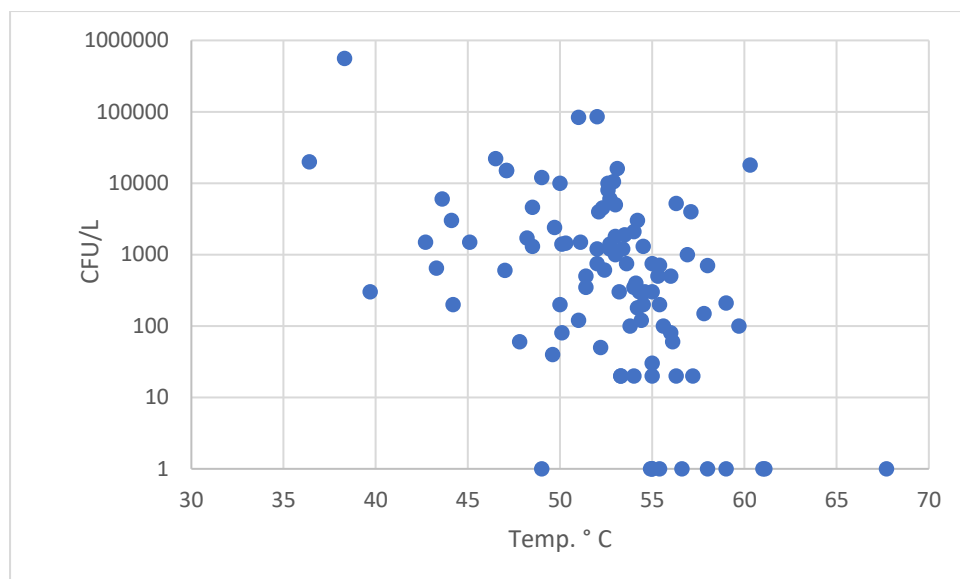
Legionella er generelt varmetolerante bakterier (specielt *L. pneumophila*), og de fleste andre bakteriearter i varmtvandssystemer dør hurtigere end *L. pneumophila* ved temperaturer > 50 °C. *L. pneumophila* kan derfor have visse konkurrencefordele i intervallet 40 til 50 °C. Dette gælder også overfor andre legionellaarter, fx vokser *L. anisa* (næst mest almindelige legionellaart i vandsystemer) ved lavere temperaturer og dør hurtigere ved temperaturer over 42 °C. Denne art kan derfor ofte dyrkes fra koldt vand (kold hane) eller blandet vand. *L. pneumophila*, kan ofte isoleres (dyrkes) fra vand, der er op til 60 °C (dog normalt lavt dyrkbart niveau). Derfor skal vandet i hele systemet - herunder i alle returstrøge mindst være 50 °C, på nær ved spidsbelastning.

Særlige udfordringerne i koblingsledninger og ved tapsteder

Trods en temperatur på over 50 °C målt ved tapsteder (efter flush), vil der ofte være områder i systemet, der i kortere eller længere tid er under 50 °C (koblingsledninger, bruserarmatur, bruseslanger, håndfri armaturer, i biofilm, døde ender, varmtvandsbeholdere og evt. i dårligt indregulerede returstrøge), hvor *L. pneumophila* kan vokse. Med den relativt lange reduktionstid, der er for *L. pneumophila* ved 50 - 55 °C, vil en anseelig andel kunne påvises som dyrkbare (og infektiøse) bakterier ved tapstedet. Først ved en temperatur ≥ 55 °C er der generelt lavt niveau af dyrkbare *L. pneumophila* (figur 3-1). Til dels er dette dog alligevel et artefakt, idet måling ved qPCR for *L. pneumophila* ofte påviser lige så høje værdier af *L. pneumophila* i prøver tappet ved høj temperatur som ved lav temperatur (straks prøver). De fleste er godt nok ikke dyrkbare og derfor ikke smitsomme (hvilket er en fordel), men det indikerer alligevel, at der kan være vækst et sted i systemet trods høj temperatur i cirkulationen og ved tapstedet. Temperatur over 50 °C (gerne 55 °C) har den fordel at udover at holde den centrale del af varmtvandssystemet fri for *Legionella*, er det muligt ret hurtigt af reducere niveauet i koblingsledninger og tapsteder (f.eks. bruser) ved få minutters flush, mens 50 °C kun i ringe grad reducerer antallet.

Stor spredning i resultaterne ved installationerne i praksis

Temperaturen er i sig selv en dårlig indikator for om et system er koloniseret (centralt eller distalt eller begge) med *Legionella*, men en høj temperatur er på den anden side en forudsætning for at kunne kontrollere væksten af *L. pneumophila* (med mindre der anvendes biocid eller andre løsninger).



Kilde: Alle prøver er fra varm hane vask (køkken eller toilet). Prøverne er taget fra forskellige institutioner. 1 = *Legionella* ikke påvist = < 100 CFU/L. Prøver udtaget af Skandinavisk Biomedicinsk Institut (SBMI) og figur er anvendt med tilladelse fra SBMI og Københavns Kommune, 2021.

Figur 3-1. Eksempel på sammenhæng mellem *L. pneumophila* niveau (CFU/L) (log. skala) og temperatur (°C) målt ved tapsted (konstant temperatur).

I figur 3-1 er resultaterne fra måling af *Legionella* (CFU/L) og temperatur vist for en række tapsteder fordelt på flere installationer. Det fremgår heraf, at der for installationer i praksis er ganske stor spredning på det konstaterede CFU/L ved en på samme tid målt temperatur, hvilket understreger vanskeligheden vedr. de kurver, som er udredt og beskrevet i de efterfølgende afsnit.

Temperaturbehandling under drift og som desinfektion

Varmetolerante *Legionella* kan udvikles, hvis et anlæg gentagne gange behandles med høje temperaturer, fx ved gentagen termisk desinficering eller ved temperaturgymnastik. Nogle rapporter viser også at mere virulente legionellatyper kan tåle højere temperaturer end mindre virulente (typiske miljøstammer). Herudover kommer at mikrofloraen ændrer sig ved behandling ved høje temperaturer. I forhold til de fleste andre vandbakterier er *L. pneumophila* mere varmetolerant.

Ved en termisk behandling vil der være mulighed for at der åbnes nye nicher for legionellavækst, når dele af den naturlige flora fjernes og systemet vender tilbage til normale driftsforhold.

De fleste værts-organismer vil dog antageligt også blive dræbt, hvilket gør at *Legionella* (for en periode i det mindste), kan have nedsat mulighed for at etablere sig. Værtorganismer kan dog også udvikle varmetolerance og kan i cysteform overleve høje temperaturer. Visse værtsorganismer fx *Vermamoeba* (tidligere *Hartmannella*) *vermiformis* kan være aktive og dele sig ved temperaturer > 50 °C og kan være den dominerende amøbeart i nogle vandsystemer [1998 Rohr].

Det skal også understreges at der for nogle legionellatyper (evt. de mest smitsomme) er et meget lille vindue (~5 °C) mellem god/maksimal vækst og ingen vækst og død, derfor kan der være meget stor forskel på legionellavækst blot ved få graders reduktion i temperaturen. [2017 Sharaby] viser at 6 ud af 32 legionellastammer vokser ved 45°C mens der ingen vækst observeres ved 48°C.

3.2 Temperaturområder med markante variationer i legionellavækst og -død

Som beskrevet i afsnit 3.1 vil forskellige legionellaarter have forskellige vækstopimum og varmetolerance ligesom det omkringliggende miljø (amøber, vandtemperatur, flow, desinfektion) vil have en betydning for vækst, overlevelse og død af *Legionella* i et givent system. Således vil resultater af laboratorie- eller pilotskalaforsøg også skulle anvendes med det forbehold at forsøgene ofte er udført med laboratoriestammer, monokultur-biofilm eller i testopstillinger, der kun simulerer miljøet i et varmtvandssystem med levende biofilm, amøber og *Legionella*.

Med denne begrænsning præsenteres vandtemperaturens effekt på *L. pneumophila* i Tabel 3-1.

Tabel 3.1. Vandtemperaturens effekt på *L. pneumophila*

Temperatur	Effekt	Reference
<20°C	<i>L. pneumophila</i> vokser ikke, men dør heller ikke. Ved længere ophold ved temperatur under 20-25°C kan <i>Legionella</i> overgå til hvilfase (ikke dyrkbare, VBNC)	[2017 WHO, 2019 Kenhove]
25 - 45°C	<i>L. pneumophila</i> kan vokse, optimal vækst mellem 30 og 40°C. Ved disse temperaturer kan et system blive koloniseret i løbet af få dage	[2017 Sharaby, 2019 Kenhove]
≥ 50°C	<i>L. pneumophila</i> vokser ikke og begynder at dø*, op mod 90% i løbet af to til fem timer. Kan dog overleve som VBNC, kan også overleve i biofilm og amøbecyster.	[2011 Allegra]
≥ 60°C	90% af <i>L. pneumophila</i> vil dø* i løbet af 10 til 30 min. Kan dog overleve som VBNC. Gentagne varmebehandlinger i dette temp. område kan medføre udvikling af varmetolerans.	[2011 Allegra, 2019 Cervero-Aragó]
≥ 70°C	~100% af <i>L. pneumophila</i> vil dø* hurtigt – få minutter. Kan dog overleve som VBNC (10 – 20% efter 60 min ved 70°C (Allegra et al., 2008).	[2011 Allegra, 2017 Wiley, 2019 Cervero-Aragó 2019 Kenhove]

* død er normalt opfattet som minusvækst, hvilket dog er misvisende, idet en større eller mindre andel kan overleve som levende men ikke dyrkbare bakterier (VBNC), som ofte kan reetablere sig hurtigt når temperaturen sænkes.

I det følgende er med reference til forskellige kilder vist eksempler på forskellige undersøgelser af vandtemperatureffekter, tidsmæssige faktorer og udfordringer:

- [2010 Farhat] der har afsæt i det franske byggeforskningsinstitut CSTB, havde opbygget en pilot-installation med henblik på bl.a. at undersøge effekten af temperaturchok. Efter at have opnået en kontaminering på 5×10^5 CFU/L blev der gennemført nogle temperaturbehandlinger på 70 °C over 30 min og efter flere forsøg blev konkluderet: "Thermal disinfection does not seem to be efficient enough to eliminate Legionella when it is used as a curative treatment".
- [2015 Rhoads] anfører at forhøjet temperatur er en kritisk faktor til at undertrykke væksten af *L. pneumophila* både i kontinuerligt recirkulerende varmtvandsledninger og ved hanen, hvor vandet hurtigt afkøles til stuetemperatur efter varmekchok. Ikke desto mindre holdt naturligt forekommende *L. pneumophila* sig levende op til 58 °C i en pilotskala brugsvandsinstallation. Dermed stærke beviser for at der ikke sker vækst over 50 °C under forenklede laboratorieforhold.
- [2017 Proctor] dokumenterer højeste antal *L. pneumophila* ved 41°C i et setup med simulerede vandvarmere, hvorimod 53°C (5-7 ugers behandlingstid) reducerede tilstedeværelsen af *L. pneumophila* og *V. vermiformis* (vært) til under detektionsgrænsen (qPCR).

- [2017 Dinne] “By applying a thermal shock at 60°C only on the contaminated water tank and the circulation loop on a regular base, the treatment of the test facility with thermal shocks at 60°C (for 0,5 ; 1 ; 2 hours) does not lead to the eradication neither to a low (<1000 CFU/L) concentrations of *Legionella* bacteria in the loop.”

Endvidere anføres bl.a., at “it seems that in a contaminated DHW installation with a permanent production temperature of 45°C a regular (even daily) thermal shock at 60°C is not appropriate as a curative treatment in hot water facilities. As the laboratory tests are promising at 65°C and 70°C, different combinations (production temperature, thermal shock temperature, duration and frequency) will be studied in the full scale test facility.”

- [2019 Cervero-Aragó] fandt ingen dyrkbare *L. pneumophila* for to specifikke stammer (*L. pneumophila* SG1 subtype mAb Benidorm og *L. pneumophila* SG1 mAb subtype Philadelphia) og vært *Acanthamoeba* efter hhv. 3-8 timer, 60 min og <2 min ved temperaturer på 55, 60 og 70°C. Samtidig viste det behov for en temperaturpåvirkning på 9 dage, 8 timer og 20 min ved hhv. 50, 60 og 70 °C for at opnå en 2 log reduktion i intakte celler, ligesom der stadig kunne vises infektion af *Acanthamoeba castellanii* for alle temperaturer.
- [2020 Rasheduzzaman] dokumenterer på baggrund af et litteratur-review vedrørende sammenhæng mellem vandtemperatur og *Legionella* i hotellers varmtvandssystemer, at der i ét studie kræves $\geq 50^\circ\text{C}$ for tilstrækkelig kontrol af *Legionella*, mens 4 studier peger på en varmtvandstemperatur på $\geq 55^\circ\text{C}$ og yderligere 5 studier anfører $\geq 60^\circ\text{C}$. Derudover konkluderes, at der i systemer med varmtvandstemperaturer på 59°C er 8% sandsynlighed for målbare *Legionella* (qPCR og dyrkning).
- [2021 Papagianeli] fandt 1,6 log reduktion af laboriestammen *L. pneumophila* serogruppe 1 i flaskevand efter 35 min, mens reduktionen ved 53, 55, 57, 59 og 61°C var 3,6, 5,4, 6,4, 6,6 og 6 log efter 35, 25, 12, 5 og 2 min.

I lærebogen [2020 Management of Legionella in Water Systems] anføres bl.a. følgende om desinfektion med temperaturbehandling:

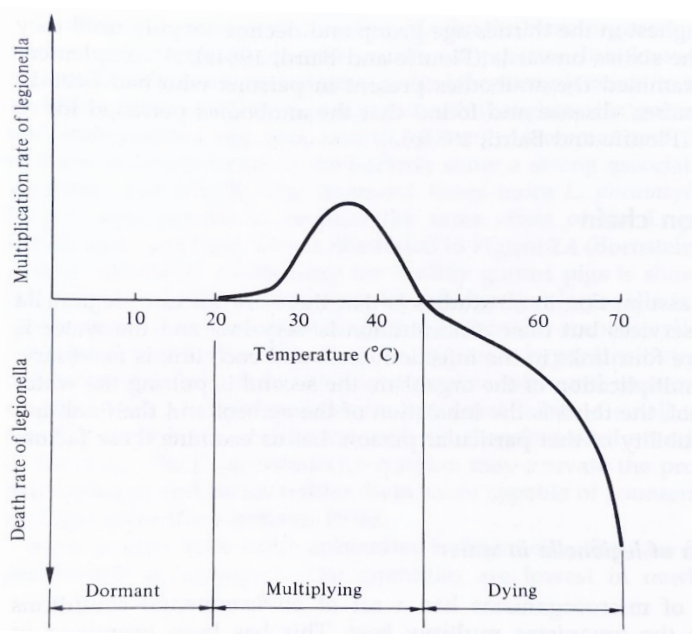
- Midlertidig forhøjelse af temperaturen eller varmechok anvendes i en række forskellige former og er generelt tænkt som en midlertidig afhjælpende eller nødforanstaltning, ikke som en forebyggende foranstaltning.
- Temperatur, varighed og hyppighed af varmechokpåføring er vigtige faktorer i sikring mod *Legionella*. Hyppige varmechok kan dog fremme fremkomsten af varmeresistente *L. pneumophila*-stammer, som observeret i hospitalsvandsystemer udsat for periodisk ekstrem temperatur (24 timer ved 65°C et par gange om året), mens der ikke blev observeret en sådan resistens, hvor varmechokbehandlinger (70°C i 30 minutter) blev anvendt sparsomt.
- Periodiske varmechok ved 60°C blev sammenlignet med et velstyret system, der kontinuerligt blev holdt ved 60°C ved at analysere *L. pneumophila* og mikrobiota i vandrørene [2018 Ji et al.]. Resultater tyder på, at opretholdelse af vandsystemet ved et sætpunkt på 60°C og vandforbrugsfrekvens er mere lovende for den langsigtede kontrol af både det mikrobielle samfund og *L. pneumophila*.
- Varmechok bør betragtes som en ekstrem afhjælpende foranstaltning på grund af sådanne potentielle problemer som (1) forskydning af partikler fra rørvægge på grund af termisk stød, som efterfølgende kan forårsage tilstopning af balanceringsventiler; (2) beskadigelse af udstyr fra vedvarende høje temperaturer; og (3) krav om tæt overvågning under processen for at beskytte patienter, personale og besøgende mod skoldning.

3.3 Fastlæggelse af kurveforløb for temperatur, tid og legionellavækst og -død

Traditionelle kurveforløb for temperatur, tid og vækst/død

Som det fremgår af de foregående afsnit 3.1 og 3.2 er der stor variation i forekomsten af *Legionella* under forskellige forhold i praksis. Det er derfor vanskeligt at udrede præcise statistiske sammenhænge, som dækker mulighederne for *Legionella* fuldt ind. For at kunne foretage ingeniørmæssige beregninger og risikovurderinger for brugsvands-installationer og komponenter er det dog hensigtsmæssigt at kunne belyse nogle overordnede funktionsmæssige sammenhænge mellem legionellavækst/-død ift. biofilm, temperatur, tid og andre influensparametre.

De grafer/kurver, som der i langt de fleste referencer bruges til at belyse sammenhængen, er udarbejdet af G. W. Brundrett i 1992 [1992 Brundrett] med baggrund i egne erfaringer samt ved inddragelse af forskellige ældre kilder fra 1982-1984 og dækkende laboratorieforsøg med *Legionella* i vand. Den centrale sammenhæng mellem temperatur og legionellavækst og -død er illustreret ved figur 3-2, og er som det fremgår uden en kvantificeret y-akse.



Kilde: [1992 Brundrett, Figure 2.6] samt en række kilder fra Gent universitet, bl.a. [2019 Kenhove, phd], ligesom der er refereret til den i flere kilder nævnt i del 3.

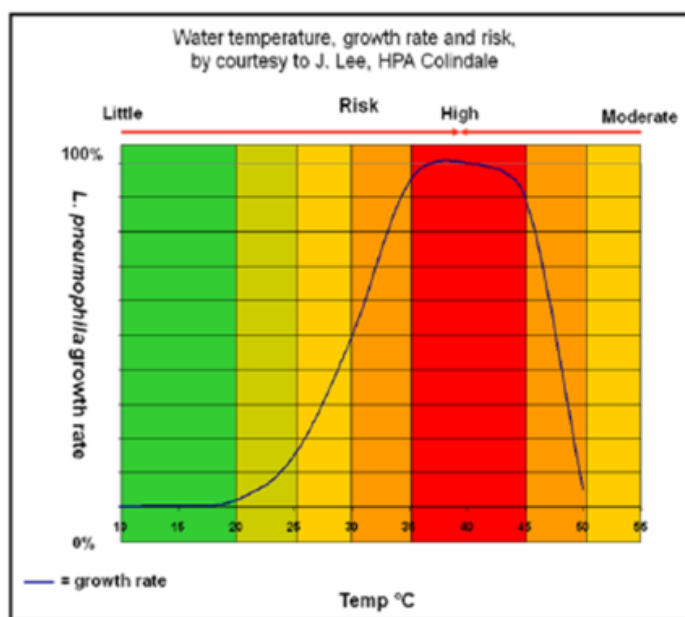
Figur 3-2 Temperaturens indflydelse på vækst og reduktion af *Legionella*.

I temperaturområdet 25 – 45 °C er der som anført i tabel 3-1 legionellavækst. Uden for dette interval vokser *L. pneumophila* som udgangspunkt ikke, men kan jf. afsnit 2.1 ofte overleve på en ikke dyrkbar form (VBNC). Ved temperaturer >50°C begynder nogle celler at dø og som for alle andre typer af desinfektion, jo højere dosis (her temperatur), jo kortere behandlingstid kræves.

Kurven vist på figur 3-2 indgår som grundlag i en lang række af de mere praksisorienterede referencer, som fremgår af delrapport 3, og der er der refereret til den som "kurve A".

I nogle arbejder er dog vist andre sammenhænge, fx den i figur 3-3 viste, der for temperaturområdet 20 – 50 °C antyder en lidt mere brat stigning og nedgang i legionellavækst samt et mellemliggende stabilt område. Denne kurve – her betegnet "Kurve B" fremgår af bl.a. flere tyske kilder, fx [2019

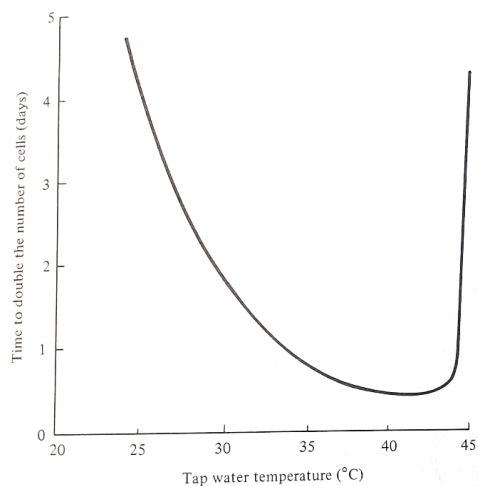
Exner] og referer til John Lee fra Health Protection Agency (HPA) i Colindale, UK [1991 Lee & West], som også har taget del i arbejdet med bl.a. WHO-publikationen *Legionella and the prevention of legionellosis* [2007 WHO].



Kilde: [2019 Exner]

Figur 3-3 Temperaturens indflydelse på udviklingen af *L. pneumophila*.

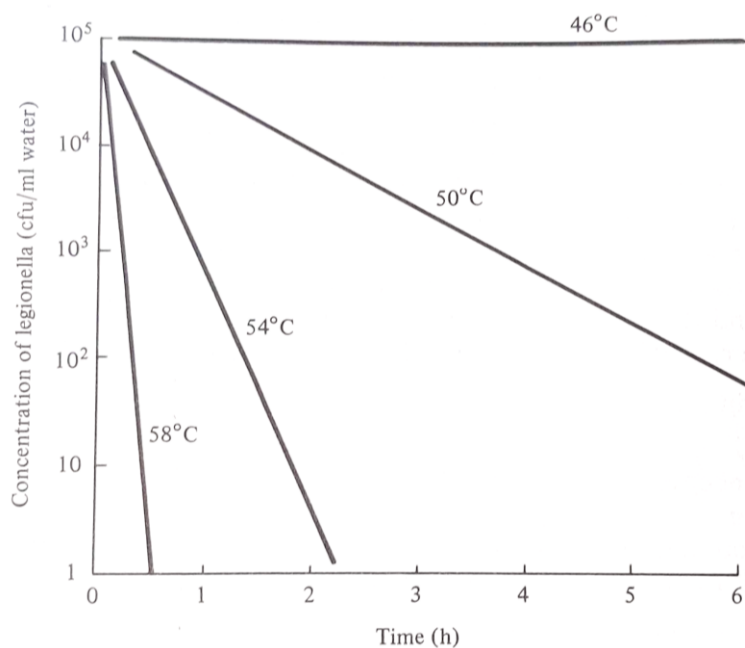
Den tidsmæssige sammenhæng mellem temperatur og vækst er med baggrund i Brundrett kvantificeret ved grafen i figur 3-4, hvor fordoblingen af legionellaceller fremgår med afsæt i data fra to kilder.



Kilde: [1992 Brundrett, Figure 1.5] samt en række kilder fra Gent universitet, bl.a. [2019 Kenhove, phd], ligesom der er refereret til den i flere kilder nævnt i del 3.

Figur 3-4 Legionellavækst (fordoblingstid) i temperaturområdet 25 – 45 °C.

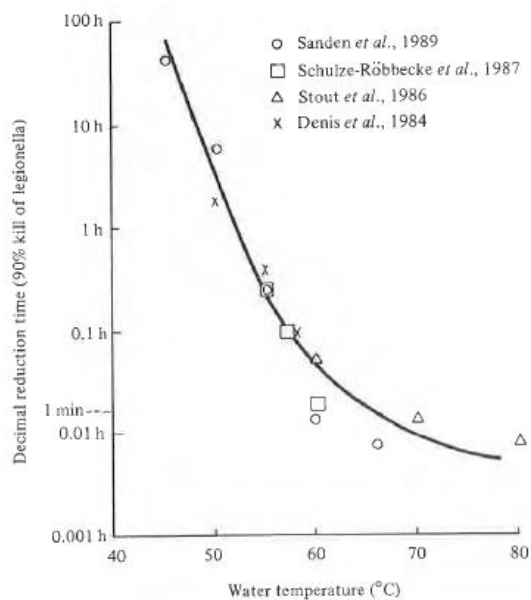
I figur 3-5 er temperaturens indflydelse på legionellakoncentrationens tidsafhængighed i vand angivet. Ud fra dette skulle koncentrationen således efter ca. 3½ time ved 50 °C være blevet reduceret fra 100.000 til ca. 1.000 CFU/ml.



Kilde: [1992 Brundrett, Figure 1.11] samt en række kilder fra Gent universitet, bl.a. [2019 Kenhove, phd].

Figur 3-5 Legionellakoncentrationens reduktion ved forskellige tidsforløb og temperaturer (46 – 58 °C).

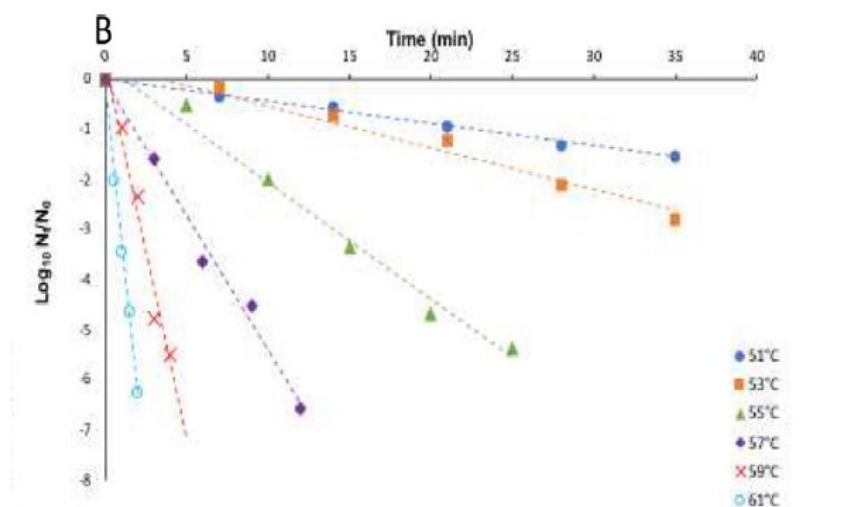
Endelig viser figur 3-6 tiden for en 90 % reduktion af *Legionella* ved forskellige vandtemperaturer.



Kilde: [1992 Brundrett] samt en række kilder fra Gent universitet, bl.a. [2015 Vliegen].

Figur 3-6 Reduktion af *Legionella* svarende til 90% døde celler iht. [1992 Brundrett] m.fl.

I en reference fra 2021 [2021 fra Papagianeli] er i Figur 3-7 vist resultaterne, hvor der ved den aktuelle præsentation på en logaritmisk skala er udredt en lineær temperaturafhængighed ift. den nødvendige tid for at opnå en given reduktionen af *Legionella*.



Kilde: [2021, Papagianeli]

Figur 3-7 Lineær logaritmisk tidsafhængighed for reduktionen af *Legionella* ved forskellige temperaturer.

Manglende hensyntagen til biofilmen

Fælles for figur 3-6 og 3-7 og andre hyppigt viste kurver er, at de bygger på laboratorieforsøg i vand. Dette er en væsentlig udfordring, da der ikke er taget højde for biofilm, da *Legionella* som anført i afsnit 2.1 her kan ligge forholdsvis godt beskyttet mod stress fra temperaturer, kemikalier, ultraviolet lys (UV) mv.

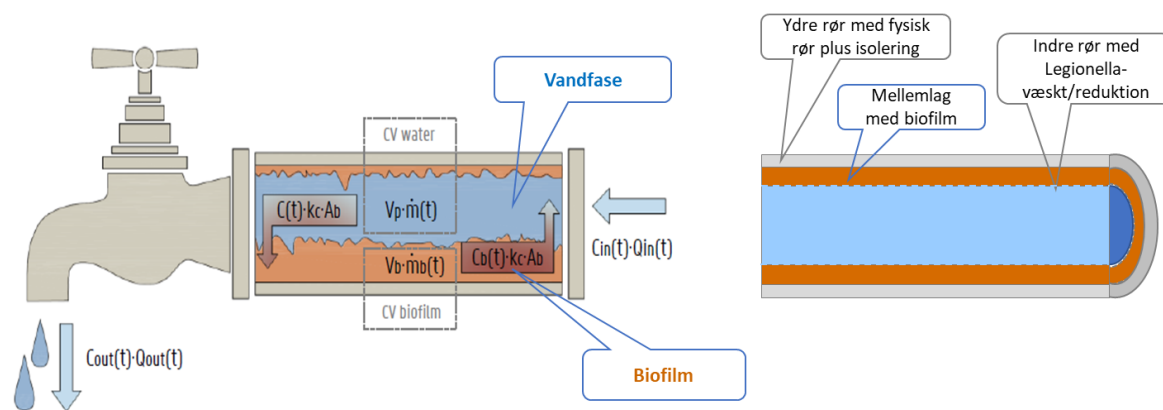
3.4 Udvikling af simuleringsmodel under hensyntagen til biofilm

Simuleringsmodel ved universitetet i Gent for undersøgelse af *Legionella* i brugsvandsinstallation

I et forholdsvis omfattende arbejde på universitetet i Gent har en forskergruppe arbejdet med problematikken og med henblik på at inddrage den i numeriske analyser af brugsvandsinstallationer. Tilgangen har været at opbygge et rørelement bestående af et rør i rør, hvor det indre rør er permeabelt og danner grænse mellem vandstrømningen og rørmellemrummet, der simulerer biofilmen, jf. illustrationen i figur 3-8. Dette element indgår så i et strømningsemæssigt simuleringsværktøj baseret på værktøjet Modelica.

I rørelementets indre rør med vandfase strømmer der vand, og her er der med baggrund i de i afsnit 3.3 beskrevne sammenhænge beskrevet et matematisk grundlag mht. *Legionella*'s udvikling og død under forskellige temperaturforhold.

Tilsvarende er der i biofilmlaget fastlagt data for udvikling og død af *legionella* i biofilmen, se det efterfølgende afsnit vedr. indregning af biofilmens indflydelse, herunder tabel 3-2 og figur 3-9.



Kilde: [2019 Kenhove(phd)] Coupled Thermo-hydraulic and Biologic Modelling of *Legionella* Pneumophila Proliferation in Domestic Hot Water Systems, Elisa Van Kenhove, 2019

Figur 3-8 Rørmodel med "doppeltrør" og mellemliggende biofilm.

Endvidere er der fastlagt et grundlag vedr. udvekslingen mellem røret med vandfase og røret med biofilm.

Som simuleringsværktøj har man primært benyttet "Modelica", se <https://modelica.org/>, der er et open source værktøj udviklet til undersøgelse af dynamiske forhold, fx væske- og temperaturstrømninger i rørledninger.

Arbejdet på Gents universitet har haft Elisa Van Kenhove som udviklingsmæssigt hovedpunkt og den primære indgang til arbejdet er især belyst gennem hendes ph.d. i 2017 [2018 Kenhove(phd)], hvor følgende målsætning er formuleret:

- *By developing a simulation model that allows predicting the concentrations in dynamic conditions, HVAC designers will be able first to thoroughly assess the Legionella pneumophila growth associated with their design and secondly to optimise the temperature regimes, choose better hydronic controls and reduce the energy demand for domestic hot water production.*

Hensyntagen til biofilmens indflydelse ved simuleringsmodel udviklet hos Ghent University

Af [2018 Kenhove(phd)] fremgår det, at der mht. reduktion af *L. pneumophila* ved temperaturer over 50 °C og i vand er taget afsæt i figur 3-6.

Hensyntagen til biofilmens indflydelse (træghed/tidsforsinkelse) på reduktion af *Legionella* er indregnet med baggrund i datagrundlag fastlagt ud fra den spanske artikel "Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free *Legionella* and Amoebae-Associated *Legionella*" [2015 Caervero-Arago] og resulterer i de i tabel 3-2 anførte værdier.

Tabel 3-2 Fastlagte 4 log-reduktionstal ved fri *Legionella* og *Legionella* i amøber.

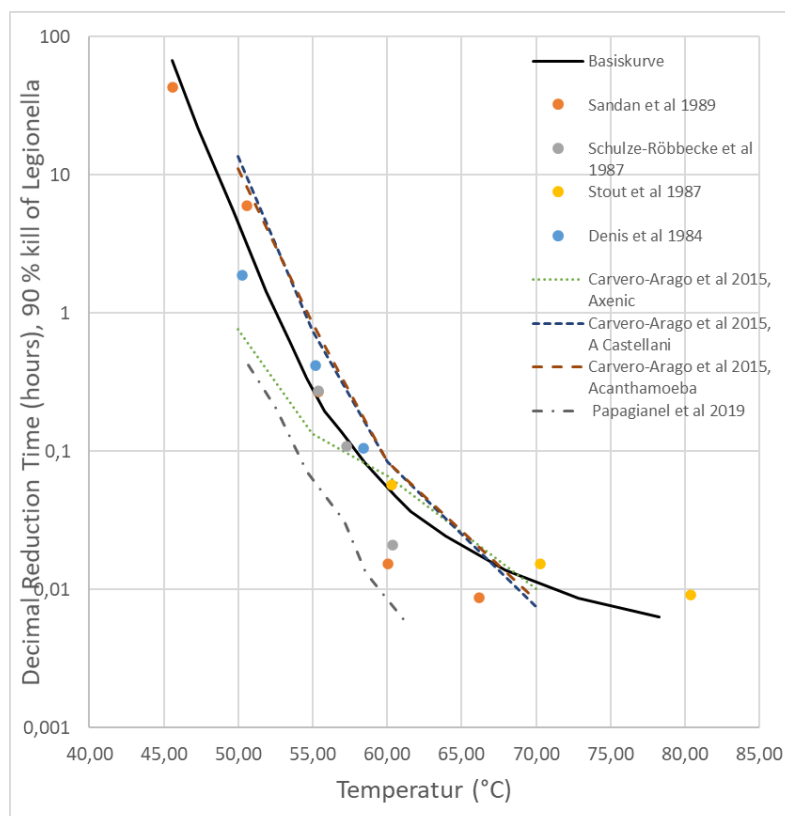
Kilde: [2018 Kenhove(phd), Table 3.1 og 106 = 2015 Cervero-Aragó]

Table 3.1 Calculated time for a 4 log reduction of L. pneumophila serogroup 1 environmentally associated with Acanthamoeba Castellani CCAP 1534/2 and Acanthamoeba species 155 after the exposure to different temperatures (adapted from [106]).

Calculated time to reduce 4 logs [minutes]				
Effect of temperature on <u>free</u> <i>Legionella</i>	50°C (R ²)	55°C (R ²)	60°C (R ²)	70°C (R ²)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env (Axenic)	46 (0.84)	8 (0.98)	4 (0.86)	0.61 (0.82)
Effect of temperature on <u>amoebae-associated</u> <i>Legionella</i>	50°C (R ²)	55°C (R ²)	60°C (R ²)	70°C (R ²)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env - <i>A. Castellani</i> CCAP 1534/2	825 (0.56)	45 (0.84)	5 (0.99)	0.45 (0.82)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env - <i>Acanthamoeba</i> sp. 155	664 (0.95)	51 (0.95)	5 (0.73)	0.50 (0.92)

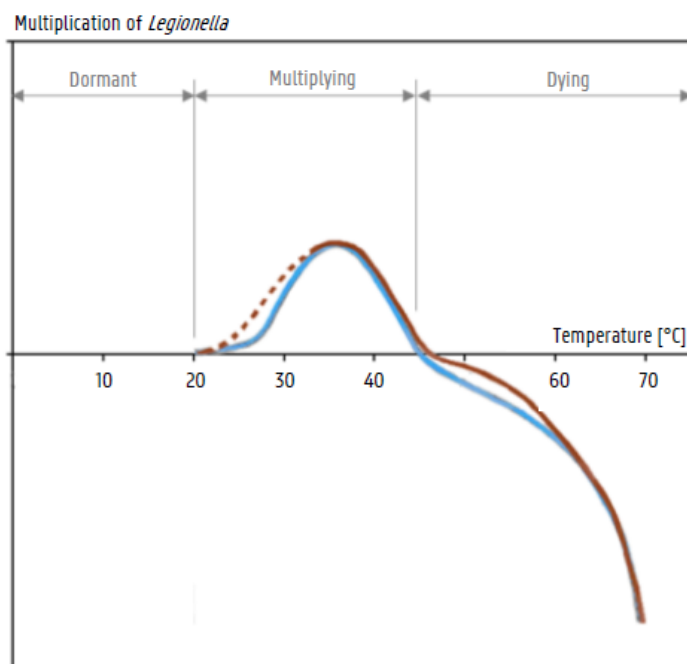
Figur 3-9 viser punkterne fra tabel 3-2 plottet ind i figur 3-6. Fri *Legionella* og *Legionella* indkapslet i amøber er anført med hhv. grøn "o" og grøn "x". Det fremgår, at i området 50 – 60 °C ligger den tidsmæssige reduktionsfaktor ved indkapsling i amøber væsentligt over værdierne for fri *Legionella*.

I figuren er endvidere indføjet de forholdsvis nye dataplot fra [2020 Papaginel] lagt ind som blå "x". Både disse værdier og de frie *Legionella* fra tabel 3-2 ligger umiddelbart lavere end det traditionelle udgangspunkt.



Kilder: Fundne laboratorieværdier fra [2015 Caervero-Argú] og [2020 Papaginel] plottet ind på figur 3-6
Figur 3-9 *Legionella* reduktion svarende til 90% døde celler og ved dels fri dels indlejret *Legionella*.

I forhold til den oprindelige "kurve A" (figur 3-2) giver hensyntagen til biofilmen anledning til de korrektioner, der fremgår af figur 3-10, hvor der med brunt er skitseret hensyntagen til biofilmen.



Tilpasset "kurve A" iflg. [2019 Kenhove(phd), Figure 3.4]

Blå kurve er den oprindelige

Brun kurve er under hensyntagen til biofilm

Figur 3-10 Den tilpassede "kurve A" svarende til hensyntagen til biofilm.

Test og validering af modellen samt det videre arbejde

Der er i afhandlingen [2019 Kenhove, phd] beskrevet testopstilling og udvalgte brugsvandssystemer, som har indgået i validering af simuleringsmodellen. Det er den umiddelbare vurdering efter læsning af rapporten, at valideringen ikke er komplet. Det fremgår dog også, at der siden afhandlingen pågår opfølgningstiltag ved andre studerende på universitetet, ligesom der pågår et vist samspil med et fransk laboratorium angående valideringen på tilsvarende testrig, som benyttes i Gent.

Med udgangspunkt i modellen er samtidig, som belyst i del 3, afsnit 3.7, blevet gennemført forskellige energimæssige vurderinger ved forskellige temperaturmæssige håndteringer af *Legionella*, ligesom der siden er blevet udviklet med inddragelse af kemiske desinfektionsmetoder mv.

Det er projektgruppens vurdering, at Gent-tiltaget er det bedste afsæt fundet for en fremtidigt mere systematisk – og mere ingeniørhåndteret behandling af legionella-problematikken under hensyntagen til de centrale variationer, der kan forekomme i praksis. Ud over sammenhængen mellem temperatur og legionellavækst/-død vil det samtidig kunne give mulighed for at undersøge vandstrømningens betydning, se afsnit 4.

I fortsættelse heraf blev i august 2022 afholdt et teams-møde med deltagelse af projektgruppen samt et par af de centrale aktører hos Ghent University, herunder Elise Van Kenhove.

Konklusionen fra drøftelserne var, at værktøjet virker som et skridt i en mere systematisk håndtering af *Legionella* i brugsvandsinstallationer, men der vurderes ud fra drøftelserne stadig at være et stykke vej til en fuldt udviklet og praksisnær model, eksempelvis:

- Der er gennemført forskellige valideringstiltag, men ikke med yderligere offentliggørelser på vej
- Den udviklede simuleringsmodel er pt. ikke kommercialiseret og ikke umiddelbart egnet for ekstern anvendelse.

Afsluttende skal anføres, at der også inden for den europæiske samarbejdsorganisation REHVA (The Federation of European Heating, Ventilation and Air Conditioning associations), som DANVAK er dansk medlem af, arbejder på tiltag angående simuleringsmodeller, se <https://www.rehva.eu/rehva-journal/chapter/energy-savings-in-hot-water-supply-by-legionella-modelling-1>.

4 VANDSTRØMNINGS OG ANDRE PARAMETRES BETYDNING FOR LEGIONELLA

4.1 Vandets strømningsforhold (flow, vandudskiftning, dimension, røroverflade mv.)

De strømningsmæssige forhold (flow) dækker flere forskellige delparametre, dvs.:

- Vandhastigheden (m/s) i rørene via vandtilførsel og cirkulation
- Vandstrømningen (l/s) via vandtilførsel og cirkulation (flowet)
- Vandudskiftningen (l/s eller i pct. af vandstrøm), der dækker over vandtilførslen over tid.

Flowet i et vandsystem har stor betydning. Hvis vandet i systemet (rør, beholdere mv.) udskiftes hurtigt og regelmæssigt, vil der ikke opstå høje koncentrationer af *Legionella* i vandfasen. Man skal være opmærksom på at biofilmen godt kan være tyk og indeholde mange bakterier (herunder *Legionella*), selvom der ikke måles høje niveauer i vandfasen. Hvis flowet/vandforbruget går ned, kan koncentrationen af *Legionella* hurtigt stige i vandfasen.

Herudover har selve flowhastigheden (den hastighed hvormed vandet fremføres) samt om det er laminar eller turbulent strømning betydning. Således bevirker en høj hastighed, at *Legionella* ikke så let sætter sig på rørvæggen, men til gengæld vil *Legionella* lettere kunne rives af fra biofilmen. Ved laminar strømning er der lavere hastighed ved rørvæggen end længere inde i røret hvilket derfor fremmer udvikling af *Legionella*, men begrænser at den rives med. I [2006 Liu], der omhandler undersøgelse af tilstedeværelsen af *Legionella* i mikrobielle biofilm i VVS-systemer, blev i en model med tre parallelle rør etableret turbulente, laminare og stagnerende strømningsforhold. Gennem eksperimenter udført med Reynolds tal fra 10.000 til 40.000 og fra 355 til 2000 blev således konstateret højere kolonital af *Legionella* fra biofilmen for røret med turbulent flow sammenlignet med røret med laminar flow. Undersøgelse af turbulent og laminar strømning på eksisterende og nydannet biofilm omtalt i [2020 Management of Legionella in Water Systems] viste dog, at turbulent flow ikke reducerede biofilmen, men i stedet steg biofilmtykkelsen og densiteten. Af sidstnævnte reference er også omtalt, at overflade/volumen-forholdet (4/D) har betydning ved at et stort relativt overfladeareal giver bedre mulighed for biofilmvækst end et lille ved samme vandhastighed.

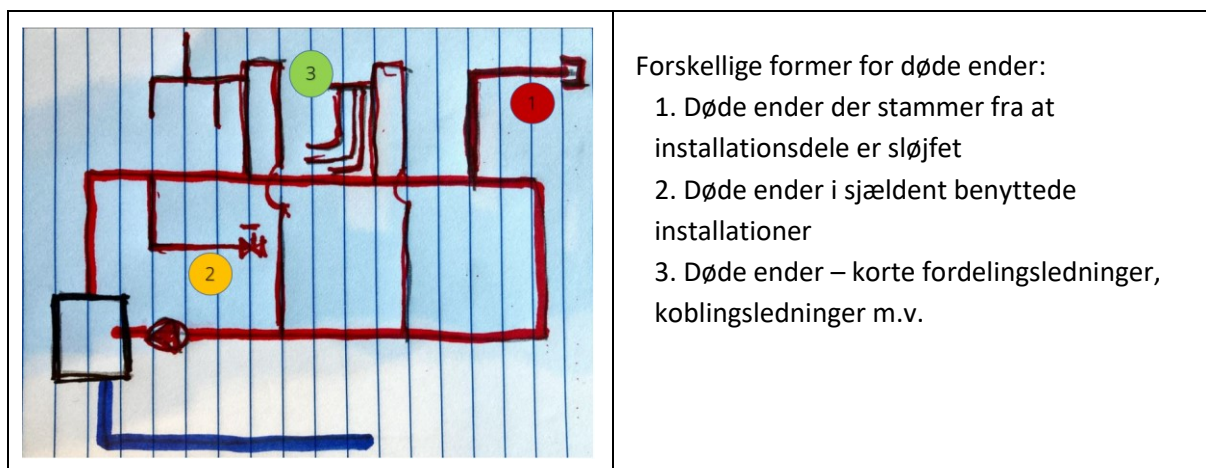
Det er generelt vanskeligt ud fra de forholdsvise få laboratoriemæssige undersøgelser at udrede præcise sammenhænge mellem de strømningsmæssige parametre og deres påvirkning på udviklingen af *Legionella* i systemet. En væsentlig årsag til dette er især, at det er meget afhængigt af biofilmens udvikling, som ikke på nuværende tidspunkt er veldokumenteret.

4.2 Stagnation og døde ender

Stillestående vand i "døde rørender", eller i rør der sjældent bliver brugt, giver gode vækstmuligheder for biofilm og *Legionella*. Dette er i [2020 Management of Legionella in Water Systems] noteret som en generel anerkendelse og fremgår af flere kilder. Eksempelvis viste en undersøgelse [1984 Ciesielski], at forebyggelse af stagnation i varmtvandsbeholdere kan være meget effektiv til at reducere *L. pneumophila*-koncentrationer i drikkevandssystemer, der betjener højrisikopopulationer, fx et hospital.

"Døde ender" kan optræde på forskellige vis i den enkelte installation, jf. figur 4-1. Det er gennem udredningen ikke lykkedes at finde forskningsmæssige publikationer, som belyser bedømmelsen af de forskellige former for "døde ender". Fra bl.a. hygiejnetekniske undersøgelser vedr.

strømningsforhold peges dog på, at længden på en afgrening (død ende) maksimalt må være 1 – 1,5 x rørets diameter.



Figur 4-1 Eksempler på døde ender.

Risikoen ved en død ende beror på, at selvom strømningsforholdene i selve brugsvandssystemet er tilfredsstillende og vandtemperaturen er over 50 °C, eller der er biocid tilstede, vil *Legionella* kunne sprede sig fra den døde ende.

Ved tapsteder, der sjældent bruges, anbefales ofte at skylle vandhanerne mindst en gang om ugen for at forhindre *Legionella*., men uden at det beror på særlige forskningsmæssige undersøgelser. En særlig udfordring er længere perioder med nedsat eller intet forbrug, fx pga. ferie, corona, og som kræver en kraftig desinfektion ved genopstart af brugsvandsanlægget.

I del 3 er emnet "døde ender" gennemgået med afsæt i forskellige standarder, anvisninger mv.

4.3 Røroverfladens betydning for *Legionella* og biofilm

Nogle materialer, fx plast og i særdeleshed naturgummi, samt visse former for syntetisk gummi, kan via det organiske materiale bidrage til biofilm og bakterievækst, herunder legionellavækst. Ved andre materialer er det muligheden for at biofilmen kan etablere sig på overfladen, der er afgørende. Jo glattere overfladen er i de vandførende rør, des sværere er det for biofilm og *Legionella* at etablere sig, specielt hvis flowhastigheden er høj.

Ved udfældninger og korrosion af rørene kan overfladens areal forøges betragteligt, og biofilm har større overflade at etablere sig på. Det er en selvforstærkende proces idet biofilm, der sætter sig fast, yderligere forøger overfladen. Desuden giver ujævnheder i rørføringen (fx ved biofilm, udfældninger, rørsamlinger og knæk) øget turbulens, og dermed større mulighed for at *Legionella* fra biofilmen rives med i vandstrømningen.

4.4 Vandets trykforhold og dets betydning

Der er ikke fundet undersøgelser, som anfører at udvikling af *Legionella* er afhængig af det specifikke vandtryk. Enkelte kilder anfører dog, at ændringer i vandtryk kan bevirke løsning af biofilm og *Legionella* og medrivning i vandet.

5 DESINFEKTION VED TEMPERATUR- OG BIOCIDBEHANDLING

5.1 Forskellige desinfektionsmuligheder

Ved konstateret biofilm og *Legionella* kan en desinfektion af brugsvandsinstallationen ske gennem anvendelse af forskellige metoder. Med henblik på løbende at forhåndssikre sig mod legionellaudbrud bruges metoderne dog i stigende grad også forebyggende og som elementer i den løbende drift.

Med især fokus på metoders fundamentale virkemåde kan de opdeles i:

- **Termisk behandling**, hvor brugsvandet varmes op til så høje temperaturer, at *Legionella* og andre bakterier hurtigt dør, dvs. typisk i området op til 60 – 70 °C, se i øvrigt afsnit 3.
- **Kemisk behandling**, hvor især oxidationsmidler såsom klor, klordioxid, kloramin og ozon bruges til at bekæmpe *Legionella* og protozoer. Desinfektionsmidlernes effektivitet afhænger af *Legionella* og deres værtsprotozoers aktuelle tilstand samt af vandets kemiske egenskaber (fx temperatur, pH, tilstedeværelse af organisk kulstof og vandets hårdhed):
 - Klor er et af de mest udbredte oxidationsmidler i mange slags vandsystemer, herunder i nogle lande til drikkevandssystemer. Det kan bruges til legionellabekæmpelse, hvis der holdes tilstrækkelige restkoncentrationer i vandsystemet. Klor hæmmer bakterievækst ved at have en negativ indvirkning på respirationsprocessen og kan enten bruges til kontinuerlig kontrol med lav dosering over længere tid eller som chokbehandling med høj dosering ved en enkelt lejlighed. Klorering kan have en negativ indvirkning på brugsvandssystemet ved at gøre vandet surt, hvilket igen kan gøre vandet mere ætsende på rør, samlinger, fittings og inventar. Desuden skulle det i nogle tilfælde kunne forårsage kræftfremkaldende sygdomme hos mennesker og ofte stilles der særlige sundhedsmæssige krav til dets anvendelse.
 - Klor kan også bruges i form af klordioxid, som normalt er et mere effektivt desinfektionsmiddel end rent klor og bl.a. effektivt til at penetrere biofilm. Det er dog ikke så effektivt som en kontinuerlig desinfektion, da det nedbrydes hurtigt og koncentrationen dermed falder.
 - Monochloramin dannes ved at tilsætte frit klor i en opløsning af ammoniumchlorid. Desinfektion med monochloramin har vundet indpas nogle steder fordi desinfektionsmidlet er mere stabilt i distributionssystemet, det minimerer dannelsen af desinfektions-biprodukter, og det kan trænge igennem biofilm bedre end frit klor. Monochloramin har en lavere klorlugttærskel end frit klor, men det har en meget lavere desinfektionseffektivitet end frit klor og kræver meget længere kontakttid eller højere dosis, hvis det bruges som primært desinfektionsmiddel. Endelig er det en udfordring, at det for ikke at stimulere nitrifikation i biofilm kræver en korrekt styring af forholdet mellem klor og ammonium.
 - Ozon angriber bakteriecellernes indre membran og deres proteinstruktur såvel som DNA. Da ozon ikke danner en stabil rest og hurtigt nedbrydes i vand, bruges det typisk ikke i bygningernes brugsvandssystemer, men primært til at desinficere vandforsyninger.
 - Ionisering virker ved at bruge to forskellige ioniserede metaller i vandet til at forstyrre bakteriers cellevægspermeabilitet og med bakteriens død til følge.. De mest udbredte elektroder er kobber og sølv, som i vid udstrækning anvendes i recirkulerende varmtvandssystemer. Den europæiske standard begrænser koncentrationen af Cu²⁺ til 2mg/L, mens grænsen for Ag⁺ ikke er defineret. I Danmark er grænserne for Cu²⁺ og Ag⁺ dog lavere end

de effektive koncentrationer, som er henholdsvis 0,1 mg/L og 0,01 mg/L, hvilket betyder at denne metode ikke kan bruges i Danmark

- **Fysisk behandling** fx med ultraviolet lys (UV), filtrering mv.:
- Ultraviolet (UV) lys, der muligvis ikke direkte dræber mikroorganismene, men snarere skader deres DNA og proteiner med lys med kort bølglængde, hvilket forhindrer dem i at replikere og blive smitsomme. UV-intensitet gange eksponeringens varighed omtales almindeligvis som fluens (mJ/cm²) og beskriver UV-desinfektionsevnen. Da UV kun er effektiv på behandlingspunktet begrænses dets anvendelse, og det kombineres typisk med et kemisk desinfektionsmiddel til vand for effektivt at kontrollere *Legionella*.
- Fotokatalyse er en ny vandbehandlingsteknik til varmtvandssystemer, hvor man aktiverer en fast katalysator såsom titaniumdioxid ved hjælp af sollys og producerer oxidanter til at dræbe bakterier. Fotokatalyse skulle bl.a. have sin styrke ved desinfektion af bakterier, der har stærk kemisk resistens. Fotokatalyse er en stabil behandling og producerer ingen giftige rester i vandsystemet, så selv lande, der har strenge politikker for drikkevandskvalitet, er i stand til at anvende denne metode.
- Filtrering forhindrer gennem membranfiltre mikroorganismene i at blive bragt videre, fx fra tapstedet til brugeren. Filtrering kan være meget effektiv, men filterets korte levetid er en af dets vigtigste begrænsninger. En anden begrænsning er at filteret let kan miste sin effektivitet ved at komme i kontakt med forurenede kilder.

Metoderne og deres fordele/ulemper er bl.a. beskrevet i [2020 Management of Legionella in Water systems] samt i [2018 Karlsson] og [2016 Yang1], der begge har særligt sigte mod metoder for anvendelse ifm. lavtemperaturfjernvarme. Sidstnævnte omfatter tillige belysning af investerings- og driftsomkostninger for de forskellige metoder.

Udgangspunktet er anvendelse af metoderne ifm. desinfektion, men af flere kilder i del 3 fremgår at metoderne har vundet bredere indpas som forebyggende metoder.

Forholdsvis detaljerede beskrivelser af metoderne fremgår af USA's Environmental Protection Agency (EPA)'s omfattende review: "EPA 810-R-16-001 - Technologies for Legionella Control in Premise Plumbing Systems: Scientific Literature Review; Office of Water" [2016 EPA 810-R-16-001], ligesom artiklen "Legionellosis and Recent Advances in Technologies for Legionella Control in Premise Plumbing Systems" [2020 Carlson] giver et godt supplement med det nyeste.

Mht. udfordringerne ved metoderne peges bl.a. på:

- Angående de kemiske at risikoen for højere korrosionshastighed i VVS-installationen og sundhedsskadelige virkninger, hvis de indtages over det maksimalt anbefalede. Desuden at det er vigtigt, at den kemiske virkning i nødvendige koncentrationer når ud til de yderste tapsteder, og der peges på, at dette kan være udfordrende, da mange nedbrydes over tid og desuden kan resultere i dannelsen af uheldige biprodukter.
- For de fysiske behandlinger, bl.a. at de i den virkelige verden er fundet besværlige og tidskrævende. Termisk inaktivering kræver fx, at alle potentielle udtag skylles i længere perioder, mens filtre skal udskiftes med jævne mellemrum for at sikre, at de ikke snavser til.

Det anføres, at de nye teknologier til dels udvikles som reaktion på disse mangler:

- UV-bestråling har været brugt som en behandlingsmetode i flere år, men ofte ikke i VVS-sammenhæng på grund af den korte levetid for kviksløvlamper og de tilhørende miljøfarer. Yderligere virker det kun på installationsstedet og kan ikke bruges til en samlet behandling. Fremkomsten af LED (Lys Emitterende Dioder) giver imidlertid mulighed for en enhed, der ved udsendelse af målrettede bølgelængder er effektiv ved "point-of-use" filtre.
- Ligeledes ser man muligheder for at anvende innovative carbon nanorør, som særligt effektive filtre.

I nærværende projektarbejde er der især fokus på temperaturens indflydelse og på anvendelse af hypoklorsyre, grundet det videre produktudviklingssigte på legionellasikring via hhv. temperaturbehandling og anvendelse af biocid. Mht. temperaturens indflydelse skal henvises til afsnit 5.3 mens muligheder og udfordringer angående anvendelse af hypoklorsyre er nærmere behandlet i det efterfølgende afsnit 5.2.

5.2 Anvendelse af hypoklorsyre mod *Legionella*

Mens anvendelse af klor, klordioxid m.fl. gennem årene er blevet omtalt i en række kilder og med tilhørende udredning af fordele og ulemper, jf. afsnit 5.1, er det noget mere begrænset, hvad der især i de ældre referencer findes angående anvendelse af hypoklorsyre (hypochlorous acid, HOCL). Senere er dog flere omtaler kommet til.

I rapporten "An Overview of Oxicide™: The Definitive Solution to Disinfection in Facility Water Distribution Systems & Equipment" [2003 Christensen] udgivet af en af producenterne af hypoklorsyre er dog givet en grundig indføring i dets virke og anvendelse.

Rapporten giver forventeligt en meget positiv vurdering af hypoklorsyres muligheder, men søger også at referere til uvildige og kendte laboratorier, jf. fx *FDA certified lab testing proved Oxicide to be non-hazardous, non-toxic and nonirritating to the skin, eyes, nor the environment, og Oxicide has been approved by NSF for use in public drinking water for scale control.*

Der er endvidere i en afsluttende tabel søgt objektivt at belyse de særlige fordele ved anvendelse af hypoklorsyre ift. andre desinfektionsmetoder, se tabel 5-1.

I EUDP-rapporten Mikrobiologisk sikker sænkning af varmtvandstemperaturen fra november 2015 [2015 DCW] har Danish Clean Water (DCW) i samarbejde med bl.a. Statens Serum Institut og Teknologisk Institut er gennemført tiltag og undersøgelser med udgangspunkt i DCW's udviklede hypoklorsyre-løsning Neuthox. Også disse viser lovende muligheder, og der er i et perspektiverende afsnit anført en række muligheder, men også udfordringer ift. den generelle anvendelse. Disse forhold og en videreudviklet løsning er belyst i nærværende projekts delrapport 5.

Item	Disinfection System							
	Oxide (HOCl)	Super Heating & Flushing	Auto-Chlorinating / Inhibitor System	Auto-Chloramine System (Mono-Chloramine)	Chlorine Dioxide	Copper-Silver Ionization System	Ozonation	Ultraviolet
Used on Domestic cold Water system	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Feasible-return loop with fixture/equipment back flow prevention required	Yes	Yes
Used on Domestic hot Water system	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Chemical Utilized	HOCl/Oxide	None	Sodium Hypochlorite	Chloramine (Chlorine & Ammonia)	Chlorine Dioxide (Sodium chlorite, sodium hypochlorite, hydrochloric acid)	Copper & Silver (Minerals)	None	None
Hazard of chemical/ Method	Non-hazardous	Scalding hazard	Hazardous Chemicals	Hazardous Chemicals	Hazardous Chemicals	Hazardous Chemicals	Non-hazardous	Non-hazardous
By-Product	Trihalomethanes (THM=S) (Far less than chlorine)	None	Trihalomethanes (THM=S)	Trihalomethanes (THM=S) (Far less than chlorine)	chlorite and chlorate	heavy metals - copper & silver	Bromate	Ozone
Effective Max. pH	9 pH	NA	7.8 pH	9 pH	10 pH	8 pH	NA	NA
Eliminates Scale buildup	Yes	No	No	No	No	No	No	No
Taste & Odors	None	None	Yes- Can cause taste & odor problems	Yes- Can cause taste & odor problems	None (below .8 ppm) - removes most taste & odors problems	None	Yes- Will add odor	None-provided high intensity ozone lamps are not used

Impact on Equipment & Systems	Minimal potential corrosion problems	Potential	Potential corrosion problems	Minimal potential corrosion problems	Minimal potential corrosion problems	Minimal potential deposition of copper on mild steel/ localized corrosion- none reported	Potential corrosion problems	Potential corrosion problems if high intensity ozone lamps are used
Impact on Dialysis Equipment	None	None	None (below 4 ppm); carbon filters and RO equipment effectively removes chlorine & by-products	Significantly difficult to remove chloramines (mono-chloramines) and by-products at 4 ppm and below; carbon filters effective, RO membrane not effective; membrane damage	None (below .8 ppm); carbon filters and RO equipment effectively removes chlorine dioxide & by-products	Information currently not available	Information currently not available	None
Environmental & Health Effects	Produces THM=S (less than chlorine)	Water is scalding temperature	Produces THM=S	Produces THM=S (less than chlorine)	Produces Chlorite. Hormonal, neurobehavioral and neurological impairments in laboratory animals	Copper is acutely toxic to many aquatic species at levels as low as 50 ppb; system operates between 200-600 ppb copper, 10-60 ppb silver	None- bromite identified as an animal carcinogen; effects on humans unknown	None
EPA Approved Primary Drinking Water Disinfectant	Pending (below 4 ppm)	No	Yes (below 4 ppm)	Yes (below 4 ppm)	Yes (below .8 ppm)	No	No	No
Breaks down Biofilm (at Nominal Operating Conditions)	Yes	Yes	No @ below 50 ppm; minimal above 50 ppm (system operates between 2-3 ppm)	No - (system operates at 2-3 ppm)	Yes	Yes/No- depending on ppm	No	No
Inhibits Biofilm (at Nominal Operating Conditions)	Yes	No	Minimal	Minimal	Yes	Yes / No (depending on ppm)	No	No

Short tem Residual Effectiveness Against Legionella (System not Operating)	Yes	Yes- (Approximately one week)	Yes	Yes- far less effective as chlorine	Yes	Yes	No	No
Labor/ Maintenance required	Minimal- Connect line to new containers of delivered solution	Significant- evacuate affected areas, open then close all fixtures.	Extraordinary- verify hazardous chemical content, supply, connections. Adjust and monitor output. Evacuate affected areas, open then close all fixtures.	Significant- verify hazardous chemical content, supply, connections. Adjust and monitor output.	Significant- verify hazardous chemical content, supply, connections. Adjust and monitor output.	Average- verify chemical content, supply, connections. Adjust and monitor output.	Average- Adjust and monitor output.	Average- Adjust and monitor output.
Flushing Required at All Fixtures at Start Up and On Periodic Bases	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Chlorine Shocking of Water System Required Prior To System Operating (Shocking Effects Bulk Water Only; No Effect on Biofilm)	No	NA	Yes	Yes	Not required	Not required	Yes	Yes

Kilde: COMPARISON CHART OF WATER DISINFECTION METHODS, [2003 Christensen]

Tabel 5-1 Tabel over forskellige desinfektionsmetoder og med fremhævelse af Hypoklorsyre.

Vejledningen *Legionnaires' disease Part 2: The control of legionella bacteria in hot and cold water Systems Review* fra britiske HSE(Health and Safety Executive) i 2014 [2014 HSE HSG274] omtaler kort anvendelsen af hypoklorsyre.

I artiklen "A Modern Approach to Disinfection, as Old as the Evolution of Vertebrates" fra 2014 [2014 Migliarina] er beskrevet konkrete anvendelser af hypoklorsyre på to hospitaler i henholdsvis Dresden, Tyskland og Asti, Italien. Det fremgår af artiklen, at løsningen med tilsætning af hypoklorsyre resulterede i den ønskede reduktion af tilstedeværelsen af *Legionella*, og at der i begge tilfælde blev konstateret signifikant nedgang inden for få uger. Det anføres dog samtidig, at det samlede organiske kulstofindhold i det behandlede vand i en periode viste sig at stige, som en plausibel konsekvens af ødelæggelsen af biofilm. Det anføres endvidere, at teknologien viser et stort potentiale for anvendelighed i en række forskellige miljøer uden negative konsekvenser for infrastruktur eller drikkevandsæstetik, men det påpeges også, at mere information om implementering og ydeevne af denne løsning er klart berettiget.

I artiklen anføres en sammenligning mellem hypoklorsyre og hypoklorit:

- *The benefits deriving from the use of hypochlorous acid (active chlorine at pH ≤ 7.5), compared to those of using hypochlorite (active chlorine at pH > 7.5) can be summarized as follows:*
 1. *Higher disinfectant efficacy of HOCl, with respect to ClO⁻ (about two orders of magnitude, as demonstrated also experimentally... accordingly, the use of HOCl makes it possible to obtain results comparable to those attainable with the use of hypochlorite, but using lower concentrations.*
 2. *HOCl apparently behaves like a source of hydroxyl radicals, rather than as a chlorine-containing oxidizing agent, thus minimizing the risk of formation of undesired byproducts.*
 3. *A neutral solution does not alter the pH characteristics of the treated liquid (often a potable water), and provides greater assurance concerning possible problems of corrosion for metal piping.*

I det tidligere nævnte EPA-review [2016 EPA 810-R-16-001] er givet en større omtale vedr. hypoklorsyre, og der anføres bl.a.:

- *The addition of chlorine to water creates two chemical species that together make up “free chlorine.” These species, hypochlorous acid (HOCl, electrically neutral) and hypochlorite ion (OCl-, electrically negative), behave very differently. Hypochlorous acid is more reactive than the hypochlorite ion and is also the stronger disinfectant and oxidant. The ratio of hypochlorous acid to hypochlorite ion in water is determined by pH, at low pH (6–7), hypochlorous acid dominates, while at high pH (>8.5) the hypochlorite ion dominates. Thus, the pH of the incoming water may be a factor when deciding upon the use of chlorine as a disinfectant or in the engineering design when addressing issues such as CT for the target organism(s).*

og:

- *Hypochlorous acid, the active disinfecting chlorine species, is in part toxic to bacterial cells by virtue of interfering with the production of energy (in the form of adenosine triphosphate (ATP)) needed for many cellular processes including heavy metal resistance enzymes (Barrette et al., 1989). The synergy between free chlorine and heavy metal ions on Legionella copper resistance mechanisms and Legionella susceptibility is generally unstudied. However, Landeen et al. (1989) showed increased (although not statistically significant) inactivation rates of L. pneumophila with copper and silver ions in the presence of 0.4 mg/L free chlorine.*

Ligeledes er hypoklorsyre omtalt i den også tidligere nævnte EPA-artikel fra 2020 [2020 Carlsson], men dog mere som en del af de samlede muligheder. I den forbindelse tydeliggøres samtidig behovet for at se på metodernes fordele såvel som deres ulemper, herunder deres mulige indflydelse på korrosion. Ikke mindst anføres: *Additionally, to be effective, these chemicals must reach the distal points of the systems at the required concentrations. This can be challenging as many of these compounds degrade over time, resulting in the formation of disinfection byproducts.*

6 ANDRE PARAMETRES OG TAPSTEDETS BETYDNING FOR LEGIONELLA

6.1 Andre parametre

I denne del 1 er udredt videnskabelige resultater for de fundamentale influensparametre ift. *Legionella* og brugsvandsinstallationer, dvs. vand, mikrobiologi, biocider, temperatur, strømningsforhold og tryk. For øvrige influensparametre, hvor dokumentationsgrundlaget ikke er så fundamentalt belyst men mere baserer sig på myndighedskrav og anvendelsen, skal henvises til del 3.

6.2 Tapstedernes indflydelse

Som belyst i afsnit 1.3 er der i nærværende arbejde primært fokus på selve brugsvandsinstallationen, hvorimod den i sidste ende afgørende faktor for om *Legionella* spredes via aerosoler, nemlig tapstederne ikke er nærmere behandlet.

Tapstederne dækker forskellige formål og med forskellige legionellamæssige udfordringer, jf.:

- Køkkenvask / Bryggersvask / Håndvask: Almindelige armaturer eller IR armaturer, der har deres fordele, men også kan være udfordrende mht. *Legionella*
- Toiletter, herunder sjældent benyttede, fx gæstetoilet
- Brusere: Selve bruserarmaturet – filtre i armaturet – termostatisk indstilling (37 – 38 °C)
- Bruserslangen – udført af silikonegummi – ofte vandfyldt konstant – temperatur aldrig over 37 – 38 °C
- Bruserhovedet – udført af plast med gummidelle – temperatur aldrig over 37 – 38 °C

Ud over at det er via aerosoldannelse at *Legionella* fra brugsvandsinstallationen videregives til mennesker, er tapstedet ofte i sig selv et forstærkende element i udvikling af *Legionella*. Det gælder især, hvis det ikke bruges i længere perioder og der i den ikke benyttede periode står vandsamlinger i det. Nogle tapsteder kan dog være forsynet med aktive filtre, jf. afsnit 5, som kan reducere *Legionella* inkl. fra installationen.

Det er via vores søgning fundet flere videnskabelige undersøgelser vedrørende bl.a. brusere og deres aerosoldannelse samt angående den videre vej til brugerne og specielt deres lunger. Her er i nogle tilfælde samtidig gennemført specifikke risikovurderinger. Disse rapporter er grundet projektets afgrænsning dog ikke blevet yderligere inddraget i arbejdet.

7 SAMLET VURDERING AF LOKALE INFLUENSPARAMETRE

7.1 Kompliceret sammenhæng mellem *Legionella* i installationen og legionærsygdom.

Af afsnit 2 fremgår, at forekomsten af *Legionella* i brugsvand i betydelig grad beror på tilstedeværelse af biofilm, samt at det især er *L. pneumophila* serogruppe 1, som er smitsom og i Danmark dækker 50 – 60% af alle tilfælde af legionærsygdom. Det fremgår samtidig, at *Legionella* ved udsættelse for stress-påvirkninger kan overgå til en særlig fase, VBNC, hvor de er levende, men ikke kan dyrkes.

Tilstedeværelsen af *Legionella* i brugsvand måles i "Colony Forming Units" per liter (CFU/L), og jo højere koncentration desto større risiko for smitte. En typisk anbefaling for en uproblematisk installation er at der maksimalt er 1000 CFU/L, men kan nå helt op på 10^4 CFU/L førend den udgør en væsentlig risiko. Der benyttes dog flere forskellige metoder til fastlæggelse af tilstedeværelsen af *Legionella*, og som det fremgår kan de udvise noget forskellige resultater, hvor qPCR typisk viser de højeste tal.

Afgørende for om en problematisk brugsvandsinstallation bevirker legionærsygdom afhænger imidlertid i høj grad af tapstedets funktion, som anført i afsnit 6. Denne del har dog ikke speciel fokus i nærværende projekt og belyses forholdsvis sporadisk.

7.2 Legionellamåling besværlig og tidskrævende og ikke udsigt til on-site-metoder

Der findes, jf. afsnit 2.3, flere forskellige metoder til bestemmelse af *Legionella* i vandprøver men typisk med en svartid på flere dage.

Det vil have mange fordele at kunne måle *Legionella* on site via in-line målinger og forskellige tiltag har været iværksat inkl. store EU HZ 2020-forskningsprojekter, men resultaterne lader vente på sig. Dvs. at on-site styringsmæssig hensyntagen til *Legionella* må ske indirekte på baggrund af måling af de influensparametre, som har størst influens på udviklingen af reduktion af *Legionella*, fx temperaturen.

7.3 Temperaturen og strømningsforholdene som de mest betydende influensparametre

Med baggrund i den gennemførte udredning i afsnit 3.1 – 3.2 tegner der sig følgende billede angående temperaturens betydning for *L. pneumophila*:

- En i praktiske brugsvandsinstallationer ganske betydelig spredning i *Legionellas* afhængighed (vækst/reduktion) af temperaturen og konstateret for såvel ældre som nyere målinger i praksis, men hvor biofilmen vurderes at være en væsentlig årsag.
- En bedre overensstemmelse angående laboratoriemæssige undersøgelser af *Legionellas* udvikling/vækst ved forskellige temperaturer i vandsystemer med amøber (næringsmulighed), og hvor der på baggrund af test og vurderinger tilbage i perioden 1980 – 1992 er beskrevet en række fundamentale sammenhænge, dels i vækstområdet 25 – 45 °C, dels når det gælder reduktionen ved temperaturer over 50 °C.
- Meget få laboratoriemæssige undersøgelser, som indregner og bedømmer betydningen af biofilm.

Samtidig er udviklingen af *Legionella* som anført i afsnit 4 i varierende grad afhængig af strømningsforholdene, dvs. vandhastigheden (fx m/s), vandgennemstrømningen/flowet (fx l/s) og vandudskiftningen (fx i s).

Der foreligger dog forholdsvis begrænsede laboratoriemæssige undersøgelser ang. strømningsforholdenes præcise betydning og i nogle tilfælde, typisk grundet de særlige forhold vedrørende biofilmen, kan der fremkomme modstridende resultater. Der er imidlertid mange vidnesbyrd, som peger på at "døde ender", dvs. hvor der af den ene eller anden grund ikke sker strømning over en periode, er særligt udsatte for tilstedeværelse af *Legionella* - og samtidig med mulighed for at dette kan spredes til øvrige dele af installationen.

Der er ikke fundet dokumentation for *Legionellas* afhængighed af fx vandets tryk og pH, men i forbindelse med anvendelse af biocider for bekæmpelse af *Legionella* har det klart en betydning, som også anført i flere referencer i del 3.

7.4 Simuleringsmodeller kan på sigt øge indsigten i temperaturens og flowets betydning

Grundet de komplekse forhold vedr. *Legionellas* temperatur- og strømningsmæssige afhængighed har der i forskellige sammenhænge været arbejdet med simuleringsmodeller med henblik på bedre at kunne bedømme mulighederne for *Legionella* i konkrete installationer.

Dette gælder især på Gents universitet i Belgien, hvor en forskningsgruppe gennem en periode har gennemført og præsenteret en række simuleringsinitiativer og bl.a. udmøntet i en ph.d.-afhandling ved Elisa Van Kenhove i 2018. Den udviklede simuleringsmodel bygger på en rørmodel opbygget af 2 rør-i-rør, og hvor der i mellemrummet mellem rørene er søgt opbygget et biofilmlag via inddragelse af nogle udvalgte laboratorieresultater, der tager hensyn til biofilmens betydning. Rørmodellen indgår i et simuleringsprogram dækkende hydrauliske- og temperaturmæssige strømningsforhold (Modelica) <https://modelica.org/> og med mulighed for at tilknytte fx undersøgelser af energiforbruget, se del 3.

I tilknytning til dette er etableret testopstillinger for verifikation af programmets *Legionella*-forudsigelser ved forskellige brugsvandsinstallationskoncepter. De første test og verifikationer blev gennemført ifm. ovennævnte ph.d.-projekt, og senere er yderligere tiltag igangsat, men uden præsentation af en samlet dokumentation.

7.5 Resulterende temperaturbegrænsninger

Temperaturer på 50 – 55 °C giver betydelig sikkerhed mod *Legionella*

Det kan ud fra de foreliggende undersøgelser og med afsæt i forskellige udredninger konstateres, at holdes temperaturen på 50 °C og derover er der overvejende sandsynlighed for at en brugsvandsinstallation kan holde sig inden for den typiske anbefaling af max. 1000 CFU/L. Skal man sikre sig næsten fuldt ud mod *Legionella* må temperaturen op på 55 °C og derover.

Kompenserende temperaturer med afsæt i indregning af biofilmeffekt

Det kan ligeledes konstateres, at de foreliggende laboratorietests, samt undersøgelser af konkrete brugsvandsinstallationer, med hensyn til biofilm, ikke giver en tilstrækkelig dokumentation til at kunne fastlægge et præcist grundlag for gennem såkaldt "temperaturgymnastik". Dvs. for at kunne kompensere lavere temperaturer i området 45 – 50 °C med højere temperaturer.

En vis indregning af biofilmeffekten kan dog ske gennem at tage afsæt i de vurderinger, der er foretaget ved universitetet i Gent og som illustreret i figur 3-10. Det skal dog bemærkes, at referencegrundlaget er forholdsvis tyndt og at der til en vis grad savnes et mere udbygget og sammenhængende datagrundlag og yderligere valideringer angående biofilmens betydning. Det er således bemærket, at universitet selv har anført nogle udfordringer ift. nogle franske laboratorieundersøgelser.

Forøgede temperaturer for desinfektion og som forebyggelse

Anvendelse af høje temperaturer 60 – 70 °C ved desinfektion og gennemstrømning af hele systemet inkl. gennem tapsteder kan være vanskelig at gennemføre, men giver generelt udmærket effekt (dog kun kortvarigt), om end nogle kilder anfører at temperaturen nærmere skal være 65 – 70 °C. Anvendelse af forhøjede temperaturer som en løbende, forebyggende handling ("temperaturgymnastik") er mere usikkert, bl.a. da der er set eksempler på, at der kan udvikles mere varme-resistente *Legionella*.

7.6 Desinfektion med biocid bl.a. i form hypoklorsyre

Desinfektion med biocid i form af klorsyre er gennem dets umiddelbart mindre miljøbelastning end andre klor-midler fortsat interessant, og der foreligger forskellige resultater, som peger på at det, ved den rette udformning og sikring af funktionsdygtighed helt ud til tapstederne, kan have den nødvendige effekt. Samtidig er det dog meget centralt, at der gennem dokumentation og risikovurdering er sikret, at funktionen er til stede under varierende driftsforhold og hel frem til tapstedet, ligesom den reelle miljøbelastning inkl. påvirkning af korrosion bør tydeliggøres.

7.7 Input til det videre arbejde

Ovennævnte konstateringer indgår som input til delraport 3, hvor de er sammenholdt med gældende myndighedskrav og anvisninger samt med diverse andre, mere installationsnære undersøgelser.

Arbejdsgruppen finder, at arbejdet med simuleringsmodeller – som især pågår hos universitet i Gent - er centralt og relevant for på sigt at kunne give præcise anvisninger om forekomsten af *Legionella*, om end der stadig er usikkerhed angående fastlæggelse af nogle af de fundamentale parametre, som indgår og anvendes i modellen. Samtidig er bemærket, at der i modelarbejdet også arbejdes på at tage hensyn til biociders virke, men samtidig at dette synes på et meget indledende stadium.

REFERENCER

År Hovedforfatter/udgiver – Titel; forfattere, udgivelse, dato

1984 Ciesielski - Role of Stagnation and Obstruction of Water Flow in Isolation of *Legionella pneumophila* from Hospital Plumbing; C.A. Ciesielski, M. J. Blaser, and Wen-Lan L. WANG, University of Colorado, Colorado, USA, 1984

1991 Lee - Survival and growth of *Legionella* species in the environment, J V Lee & A A West, Society Applied Bacteriology Symposium series. Suppl., 70, 121S – 129S)

1992 Brundrett - *Legionella* and Building Services; Geoffrey Brundrett, Oxford, 1992

1998 Bagh - Mikrobiologisk vandkvalitet i varmtvandsinstallationer; Ph.d., Lene Bagh, SBI-Rapport 298, 1998

1998 Comparison of free-living Amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance; Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M., Appl Environ Microbiol. 64(5):1822-1824, 1998-05

1999 Kusnetsov - Growth, respiration and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures; Kusnetsov JM, Ottolia E, Martikainen PJ. Growth, J Appl Bacteriol, 81:341-347, 1999

2000 SSI - *Legionella* i varmt brugsvand – Overvågning, udredning og forebyggelse af legionærsygdom, Den Centrale Afdeling for Sygehushygiejne, Statens Serum Institut

(2002 Lee - Guideline for investigation single cases of Legionnaires disease; Lee et al, Communicable Disease and Public health), UK, 2002

2002 Helbig - Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups; Helbig JH, Bernander S, Pastoris MC, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Lück PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21(10):710-716, 2002-10

2002 Faulkner - Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*; G. Falukner and J Bacteriol, 2002,184(24):7025-7041), 2002

2002 Garduño - Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms; Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS, Infect Immun, 70(11):6273-6283, 2002

2002 Surman - *Legionella pneumophila* proliferation is not dependent on intracellular replication; Surman, S., Morton, G., Keevil, B. and Fitzgeorge, R., 2002

2003 Christensen - An Overview of Oxicide™ - The Definitive Solution to Disinfection in Facility Water Distribution Systems & Equipment; Eric W Christensen, AIA, February 2003

2003 Martiny - Long-Term Succession of Structure and Diversity of a Biofilm Formed in a Model Drinking Water Distribution System; Adam C. Martiny, Thomas M. Jørgensen, Hans-Jørgen Albrechtsen, Erik Arvin, and Søren Molin, BioCentrum-DTU & Risø National Laboratory, Denmark, 28 July 2003

EUDP Legionellasikring – Delrapport1: Lokale influensparametre for *Legionella*

2022-11-15

2006 Liu - Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system; Z. Liu, Y.E. Lin, J.E. Stout, C.C. Hwang, R.D. Vidic, V.L. Yu, 19 June 2006

2007 WHO - *Legionella* and the prevention of legionellosis, WHO, 2007 -> se Delrapport 3

2008 Allegra - Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability; Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B, Riffard S., *App Environ Microbiol*, 74(24):7813-7816, 2008

2010 Farhat - Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation; M Farhat, M-C Trouilhé, E Briand, M Moletta-Denat, E Robine and J Frère, *Applied Microbiology*, March 2010

2011 Lee – An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems; J.V. Lee, S. Lai, M. Exner, J. Lenz, V. Gaia, S. Casati, P. Hartemann, C. Lück, B. Pangon, M.L. Ricci, 29 January 2011

2011 Allegra - Longitudinal Evaluation of the Efficacy of Heat Treatment Procedures against *Legionella* spp. in Hospital Water Systems by Using a Flow Cytometric Assay; Severine Allegra, Florence Grattard, Françoise Girardot, Serge Riffard, Bruno Pozzetto, and Philippe Berthelot, February 2011

2012 Buse HY, Ashbolt NJ. Counting *Legionella* cells within single amoeba host cells. *Appl Environ Microbiol* **2012**, 78(6), 2070-2072, 2012

2012 Ricci - Pneumoniae associated with a dental waterline; Ricci ML, Fontana S, Pinci F, Fiumana E, Pedna MF, Farolfi P, Sabbatini MAB, Scaturro M., *Lancet*, 2012.

2014 HSE HSG274 - Part 2: The control of *legionella* bacteria in hot and cold water, Health and Safety Executive, UK, 2014

2014 Migliarina - A Modern Approach to Disinfection, as Old as the Evolution of Vertebrates; Franco Migliarina and Sergio Ferro, University of Ferrara, Ferrara, Italy, December 2014

2014 Robertson - The many forms of a pleomorphic bacterial pathogen - the developmental network of *Legionella pneumophila*; Robertson P, Abdelhady H, Garduño RA. *Front. Microbiol.*

2014 Wang - Effect of Disinfectant, Water Age, and Pipe Materials on Bacterial and Eukaryotic Community Structure in Drinking Water Biofilm; Hong Wang, Sheldon Masters, Marc A. Edwards, Joseph O. Falkinham, and Amy Pruden, Virginia 24061, United States, 2014

2015 Cervero-Arago - Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free *Legionella* and Amoebae-Associated *Legionella*; Sílvia Cervero-Aragó, Sarah Rodríguez-Martínez, Antoni Puertas-Bennasar, Rosa M Araujo, 4 August 2015

2015 Giao - Influence of copper surfaces on biofilm formation by *Legionella pneumophila* in potable water; Giao S, Wilks SA, Keevil CW; *BioMetals*, 2015-01

2015 Proctor - Drinking water microbiology — from measurement to management; Caitlin R Proctor and Frederik Hammes, Eawag, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Switzerland, *Biotechnology* 2015, 33:87–94, 9th January 2015

2022-11-15

2015 Vlieger – Dynamic Thermal modelling of *Legionella pneumophila* proliferation in Domestic Hot Water Systems; Peter De Vlieger, Elisa Van Kenhove, Arnold Janssens and Jelle Laverge, Ghent University, Ghent, Belgium, 2015-12

2016 Deuterelo - Spatial and temporal analogies in microbial communities in natural drinking water biofilms; I. Douterelo, M. Jackson, C. Solomon, J. Boxall, Sheffield & Bath, UK, 30 December 2016

2016 EPA 810-R-16-001 - Technologies for *Legionella* Control in Premise Plumbing Systems: Scientific Literature Review; Office of Water, EPA 810-R-16-001, September 2016

2016 Lesnik - *Legionella* species diversity and dynamics from surface reservoir to tap water: from cold adaption to thermophily; Lesnik R, Brettar I, Höfle MG; ISME J, 10(5):1064-1080, 2016

2016 SSI - *Legionella* vejledning- risiko og tolkning af vandanalyser, Statens Serum Institut

2018 CYTO-WATER – EU Hz 2020-projektet CYTO-WATER - Integrated and portable image cytometer for rapid response to *Legionella* and *Escherichia coli* in industrial and environmental waters; Labaqua/Spain et al - er beskrevet og dokumenteret på

<https://cordis.europa.eu/article/id/435249-new-photonics-sensor-to-quickly-spot-bacteria-and-pesticides-on-fruit-and-vegetables>, hvor der samtidig er henvist til artikler fra 2016 og 2017

2018 Dietersdorfer - Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoeba and human macrophages. Water Research, Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H et al; 141:428-438, 2018

2018 Karlsson - Overcoming issues with *Legionella* in DHW in LTDH systems, Linita Karlsson & Klara Ottosson Lunds Universitet, 2018-06

2018 Liu - Assessing the origin of bacteria in tap water and distribution system in an unchlorinated drinking water system by SourceTracker using microbial community fingerprints; Gang Liu, Ya Zhang, Ed van der Mark, Aleksandra Magic-Knezev, Ameet Pinto, The Netherlands & United States, 16 March 2018

2018 POEIDON – Plasmonic-based automated lab-on-chip sensor for the rapid in-situ detection of *Legionella*; CLIVET SPA/Italy et al - er beskrevet og dokumenteret på bl.,a.

<https://cordis.europa.eu/project/id/644669>, hvor der samtidig er henvist til artikler fra 2016 og 2017. Endvidere foreligger marts 2022 en tilbagemelding om projektet fra projektets faglige projektleder Roberto Pierobon fra firmaet PROTOLAB SRL

2018 Spies - Comparison of the Legiolert™/Quanti-Tray® MPN test for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable water samples with the German regulatory requirements methods ISO 11731-2 and ISO 11731; Kirsten Spies, Stefan Pleischl, Bernd Lange, Bettina Langer, Iris Hübner, Lars Jurzik, Katrin Luden, Martin Exner; Int. J. of Hygiene and Environmental Health, August 2018

2019 Cervero-Aragó - Viability and infectivity of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* strains induced at high temperatures; Cervero-Aragó S, Schrammel B, Dietersdorfer E, Sommer R, Lück C, Walochnik J, Kirschner A.; Water Research, 158:268-279, 2019

2019 Kenkove - Overview and comparison of *Legionella* regulations worldwide; Elisa Van Kenhove, Karla Dinne, Arnold Janssens & Jelle Laverge, 2019

2019 Kenhove(phd) - Coupled Thermohydraulic and Biologic Modelling of *Legionella Pneumophila* Proliferation in Domestic Hot Water Systems, Elisa Van Kenhove, 2019

EUDP *Legionellasikring* – Delrapport1: Lokale influensparametre for *Legionella*

2022-11-15

2019 Exner - Strategies for monitoring and control microbial risks in health care, Martin Exner, IPH Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Bonn, 2019-10

2019 Hove - Design and operation of domestic hot water systems: optimisation using building energy simulation; Matthias Van Hove, Elisa Van Kenhove, Lien De Backer, Jelle Laverge, Arnold Janssens, CLIMA 2019 Congress, Proceedings, 2019

2020 Legionella management - Management of Legionella in Water Systems Committee on Management of Legionella in Water Systems - A Consensus Study Report of Water Science and Technology Board, Board on Life Sciences; 290 pages, Board on Population Health and Public Health Practice, Division on Earth and Life Studies, Health and Medicine Division, National Academy of Sciences, Washington, 2020

2020 Carlson - Legionellosis and Recent Advances in Technologies for Legionella Control in Premise Plumbing Systems - A Review, Kelsie M. Carlson, Laura A. Boczek, Soryong Chae and Hodon, United States Environmental Protection Agency & University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45268, USA, 2 March 2020

2021 Walker - Confirming the presence of *Legionella pneumophila* in your water system: A review of current *Legionella* testing methods; Walker JT, McDermott PJ., J AOAC Int, 104(4):1135-1147.

BEGREBER OG FORKORTELSER

Biocid	Middel til bekæmpelse af skadelige, levende organismer, fx <i>Legionella</i> . Biocid kan anvendes som alternativ til temperaturbehandling og temperaturdesinfektion
BR	Bygnings Reglementet udgivet af Bolig- og Planstyrelsen med baggrund i gældende dansk byggelovgivning
CFU/L	Colony Forming Units per Liter, dvs. måleenhed for bl.a. indhold af <i>Legionella</i>
DNA	Kommer af eng. DeoxyriboNucleic Acid; et molekyle, som bærer på de genetiske instruktioner, der bruges ved vækst, udvikling, funktion og reproduktion af alle kendte levende organismer og mange vira
EN	Europæisk standard udgivet af CEN, den europæiske standardiseringsorganisation
IEA	International Energi Agentur
Influensparameter	Fysisk, kemisk eller anden påvirkning, som influerer på risikoen for <i>Legionella</i> i en brugsvandsinstallation, fx vandets temperatur, strømningsforhold, vandtryk og vandkvalitet
ISO	International standard udgivet af ISO, den Internationale Standardiserings Organisation
LED	Lys Emitterende Dioder
<i>Legionella</i>	Bakterie af slægten <i>Legionella</i> , især bakterien <i>Legionella pneumophila</i> , der er den primære årsag til legionærsygdom
<i>Legionella pneumophila</i> , eller <i>L. pneumophila</i>	Den <i>Legionella</i> -art der er årsag til over 90% af danske tilfælde af legionærsygdom.
MIF	Mature Infectious Form, dvs. moden, smitsom form
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction og er en teknologi benyttet til kvantitativ måling af DNA ved hjælp af Polymerase Chain Reaction
Serogruppe	Opdeling af <i>Legionella</i> baseret på reaktion med antistoffer. <i>Legionella pneumophila</i> omfatter 16 forskellige serogrupper hvor serogruppe 1 er hyppigste årsag til sygdom
Temperaturdesinfektion	En temperaturpåvirkning, som sikrer desinfektion af rørinstitutionen, se i øvrigt del 3, afsnit 5.3
Temperaturgymnastik	En hyppigt anvendt betegnelse for en løbende temperaturkompensering, suppleret med en helt/delvis temperaturdesinfektion; se i øvrigt del 3, afsnit 5.3
Temperaturkompensering	Temperaturpåvirkning, der med henvisning til sammenhæng mellem temperatur, tid og vækst/reduktion af <i>Legionella</i> søger at modregne periodevis for lave temperaturer (typisk under 50 °C), med anvendelse af højere temperaturer, se i øvrigt del 3, afsnit 5.3
UBA	Umwelt Bundes Amt, den tyske miljøstyrelse

2022-11-15

UV	Ultra Violet lys
VBNC	Vaible But Non-Culturable, dvs. en levende men ikke dyrkbar form
WHO	World Health Organization, den internationale sundhedsorganisation
Virulens	Mikroorganismers evne til at fremkalde sygdom, dvs. smitsomheden