



Projekt 2 - Undersøgelse af vandprøver som indikator for legionellatilfælde og typer

Indhold

INDLEDNING OG SAMMENFATNING	3
BAGGRUND	5
<i>Legionella</i> forekomst og levevis.....	5
Typning af <i>L. pneumophila</i> og <i>L. pneumophila</i> smitsomhed	6
Sygdom	8
Legionærsygdom i Danmark.....	9
Hvor bliver man smittet i Danmark?	12
Hvad bliver man smittet med i Danmark?	13
Geografisk fordeling af legionærsygdom i Danmark	16
PROJEKT 2 – VANDPRØVER.....	18
Formål.....	18
Materialer og Metoder	18
Resultater	20
<i>Overordnede resultater – dyrkning</i>	20
<i>Sammenhæng mellem temperatur og cfu/L</i>	20
<i>Dyrkningsresultater for de 4 byer</i>	23
<i>Resultater af serogruppebestemmelse af isolater fra de fire byer</i>	25
<i>Resultater af sekvenstypebestemmelse af isolater fra de fire byer</i>	26
<i>Karakteristik af ejendomme og varmtvandssystemer</i>	28
A Sammenhæng mellem ejendomsstørrelse og cfu/L	28
B Sammenhæng mellem ejendomsalder og cfu/L	29
C Varmtvandssystemerne.....	29
<i>Sammenhæng mellem temperatur og <i>L. pneumophila</i> qPCR (GU/L) for B prøver</i> 29	
<i>Korrelation mellem dyrkning (cfu/L) og qPCR (GU/L) for <i>L. pneumophila</i></i>	31
<i>Resultater for <i>Legionella</i> spp. qPCR</i>	34
Diskussion af resultater for hver af de fire byer	35
<i>Randers</i>	36
<i>Odense</i>	38
<i>Aalborg</i>	42
<i>Esbjerg</i>	44
Generel diskussion og delkonklusioner	46
<i>Resultater for dyrkning af <i>Legionella</i> sammenholdt med influensparametre</i>	46



<i>Reaktionsgrænser</i>	48
<i>Sammenfatning for de fire byer</i>	50
<i>Kvantitativ PCR (qPCR)</i>	51
<i>Sammenligning med udlandet</i>	53
Konklusion.....	56
BOLIGFORENINGER.....	59
LITTERATURLISTE.....	60
APPENDIX I.....	65
Legionella under COVID-19 pandemien, Danmark, 2020.....	65



INDLEDNING OG SAMMENFATNING

I marts 2018 blev der sat politisk fokus på *Legionella* i Danmark med et beslutningsforslag i Folketinget om at nedbringelse af risikoen for at blive smittet med *Legionella* i Danmark. En tværfaglig arbejdsgruppe blev nedsat til først at lave en statusredegørelse og efterfølgende gennemføre en række undersøgelser for at afklare mulige årsager til det stigende antal af registrerede danske tilfælde med legionærsygdom. Der blev afsat i alt 2 mio. kr. på finansloven for 2019 til arbejdet. Denne undersøgelse gennemfører en del af det beslutningsgrundlag, der blev lavet for at udmønte bevillingen.

I Danmark er antallet af registrerede tilfælde steget siden 2013 fra 113 tilfælde til 278 tilfælde i 2020. Danmark har desuden et af de højeste antal smittede i forhold til befolkningens størrelse (siden 2017 ca. 4,5 tilfælde per år per 100.000 indbyggere) sammenlignet med andre europæiske lande; også i forhold til lande med god diagnostik og god overvågning. Erfaringer fra undersøgelse af rutine/kontrolprøver og fra tidligere mindre undersøgelser af varmtvandsinstallationer indikerer endvidere, at Danmark kan have relativt flere installationer med forekomst af *Legionella* end andre lande. Der er dog ikke tidligere gennemført en systematisk undersøgelse af dette og om hvorvidt den høje forekomst af mere eller mindre smitsomme legionellatyper kan være årsag til regionale forskelle og det høje smittetal.

Denne viden er vigtig for, at bl.a. bygningsejere såsom kommunerne bedre kan forebygge legionellavækst og derigennem smitte. Derudover kan denne viden bidrage til et nationalt risikobillede og til bedre at fastsætte hvilke grænseværdier for forekomst af *Legionella*, der bør handles på (reaktionsgrænser)

Nærværende rapport beskriver en undersøgelse af, hvorvidt Danmark har en høj frekvens af *Legionella* i installationer i beboelsejendomme, sammenlignet med andre lande. Herudover undersøges om høje niveauer og tilstedeværelse af forskellige typer af *Legionella* hænger sammen med antallet af tilfælde med legionærsygdom i de undersøgte områder. Der er udvalgt fire byer for at belyse dette. Dels to byer med generelt højt antal, dels to byer med generelt lavt antal af legionellatilfælde. Undersøgelsen skal ses i sammenhæng med et andet projekt, som beskriver og belyser årsager til regionale forskelle i smitte, og gennemføres i den tværministerielle arbejdsgruppe.

Overordnet viste undersøgelsen, at der var en høj rate af anlæg, der var koloniseret med *Legionella* og at ca. halvdelen havde forholdsvis høje koncentrationer af *Legionella*, der overstiger de reaktionsgrænser der generelt anvises i nationale og internationale vejledninger/retningslinjer. Anlæggene var koloniseret med legionellatyper der generelt betragtes som mindre smitsomme (miljøtyper), hvilket hænger godt sammen med at disse typer er årsag til de fleste tilfælde af legionærsygdom i Danmark, hvorimod de fleste tilfælde i andre europæiske lande skyldes mere smitsomme typer (kliniske typer), der er sjældnere i miljøet. Det høje niveau af tilfælde med mindre smitsomme typer i Danmark skal dog også ses i lyset af, at man i Danmark primært diagnosticere legionærsygdom med polymerase kæde reaktion (PCR), der kan påvise alle typer, mens man i andre lande primært diagnosticerer legionærsygdom med *Legionella pneumophila* urin test (LUT), der stort set kun kan påvise *Legionella pneumophila* serogruppe 1 infektion.



Resultaterne peger på at forskellene i antal registrerede tilfælde i de fire byer sandsynligvis kan forklares ved en kombination af forekomst af forskellige *Legionella pneumophila* typer og graden af kolonisering/niveauer af *Legionella pneumophila* i anlæg i de fire byer.

Undersøgelsen peger på en udbredt forekomst og høje niveauer af *Legionella* i varmtvandsinstallationer i danske beboelsesejendomme. Vandprøverne er undersøgt med kvantitativ dyrkning og med kvantitativ PCR (qPCR) og belyser niveauerne med begge metoder. Begge metoder har fordele og ulemper men kan anvendes til en risikovurdering af varmtvandsystemer. Resultaterne kan anvendes til at fastsætte nationale reaktionsværdier, men kan i sig selv ikke fastslå disse niveauer, idet fastsættelse af niveauer skal ses i sammenhæng med de følgevirkninger der kan være som forøget energiforbrug, omkostninger ved renovering af anlæg med videre. Desuden vil krav til forøget undersøgelse af vandprøver også have økonomiske konsekvenser alt efter hvilke ejendomme, anlæg, institutioner med videre man ønsker at fastlægge grænseværdier for.

Undersøgelsen kan ikke give et svar på, hvorfor der sket en store stigning i registrerede tilfælde af legionærsygdom i Danmark. Undersøgelsen peger dog på, at generelt for lave temperaturer i varmtvandsystemerne bidrager til de relativt høje niveauer der er påvist. Der har gennem en årrække været fokus på energibesparelse, hvilket kan være årsag til at en stor del af anlæg i dag drives med for lave temperaturer. Med til billedet af den registrerede stigning hører også en forbedret overvågning og en eventuel øget testaktivitet. Første punkt omtales i denne rapport, andet punkt belyses i et andet projekt, som undersøger årsager til regionale forskelle i smitte. Der mangler fortsat meget viden om *Legionella*, herunder hvilke faktorer der er korrelerede med forekomst af smitsomme/mindre smitsomme typer, herunder er det interessant at vi i Danmark kun ser meget få tilfælde med mere smitsomme typer, og også har meget få udbrud (flere tilfælde smittet fra samme kilde). Udbrud kan dog forekomme, og et større udbrud er påvist. Mere smitsomme typer kan brede sig geografisk og en forsats overvågning på dette område er vigtigt.

Rapporten er bygget op på den måde, at inden undersøgelsens metode, data og resultater præsenteres vil den tilgængelige viden om *Legionella* gennemgås, ligesom der vil gives lidt baggrund for at forstå undersøgelsens metoder.



BAGGRUND

Legionella forekomst og levevis

Flere bakteriearter tilhørende familien Legionellaceae (ca. 60 kendte) kan være årsag til legionærsygdom, der er en alvorlig behandlingskrævende lungebetændelse, eller Pontiac feber, der er en influenza lignende selvlimiterende sygdom. Der er forholdsvis stor konsensus om, at familien kun indeholder én slægt *Legionella* (Khodr, 2016). *Legionella* er små (ca. 2 µm) aerobe, stavformede Gram-negative bakterier, som forekommer i og kan isoleres fra våde/fugtige ferskvandsmiljøer, herunder fra slam, mudder og jord. *Legionella* arter kan vokse ved temperaturer fra 5 til 50 °C. *L. pneumophila* formeres dog kun ved ret høje temperaturer over 20 °C, og generelt er der bedst vækst ved 30 til 40°C, men nogle "typer" har dog optimal vækst meget tæt på 50 °C (42 til 45 °C) (Sharaby, 2017). I miljøet lever de i komplekse samfund med andre bakterier og andre mikroorganismer i en biofilm og er naturlige parasitter hos fritlevende Protozoer, herunder Amøber og Ciliater. Herimod er ingen af arterne naturlige patogener hos højerestående dyr (hvor de er opportunistiske patogener). Nogle *Legionella* arter (herunder *L. pneumophila*) kan også vokse uden for deres naturlige værtsceller, bl.a. på vækstmedier, hvis de rette forhold og næringsstoffer er tilstede, men her vil de ikke udvikle sig til en infektiøs form. Kun ved vækst og modning i deres værtsceller udvikles den infektiøse form/fase (Garduño 2002). Denne form findes frit i miljøet, og i denne fase har de fleste arter en til to flageller. Nogle arter, herunder *L. pneumophila* og *L. longbeachae*, har evnen til at inficere og formere sig i humane alveolære (lunge-)makrofager, og på den måde give årsag til lungebetændelse. Men de "modnes" ikke på samme måde i makrofagerne som i protozoerne, hvilket man mener er årsagen til, at der ikke (eller kun meget sjældent) sker smitte fra person til person. Smitte sker derimod primært ved indånding af forstøvet vand (aerosoler), der er forurenset med bakterierne, men smitte kan også ske ved fejlsynkning (aspiration). Desuden kan smitte også foregå ved indånding af forstøvet "jord/kompost". Dette er specielt kendt for *L. longbeachae*, som primært smitter ved arbejde med jord/kompost, og er en hyppig årsag til legionærsygdom i Australien og New Zealand (Kenagy, 2017), men er også påvist ret hyppigt i nogle europæiske lande (Buté, 2017). Det er muligt at lignede, eller andre eksterne kilder (eventuelt naturlige), også kan være en smittevej for nogle "typer" af *L. pneumophila*, idet man for nogle af de mest smitsomme *L. pneumophila* "typer", som sjældent kolonisere varmtvandssystemer, ikke kender alle smittevejene (Euser, 2013).

L. pneumophila har optimale temperaturforhold i mange menneskeskabte miljøer, herunder køletårne, spabade, renselanlæg, forstøvere og varmtvandssystemer. *L. pneumophila* er årsag til langt de fleste tilfælde (>90%) af legionærsygdom i Europa, Japan og USA. I Europa regner man med at mere en 95% af alle tilfælde skyldes *L. pneumophila* (Buté, 2017), men der er antageligt et mørketal, idet det er vanskeligt at diagnosticere tilfælde forårsaget af andre arter. Baseret på hvad der kan dyrkes, er det således 2-4% af tilfældene der skyldes andre arter (Buté, 2017), men baseret på PCR (påvisning af *Legionella* DNA i luftvejsprøver) er det omkring 5-7% der skyldes andre arter (Svarrer, 2012). Ved dyrkning af vandprøver er det også primært *L. pneumophila* man kan påvise, mens qPCR (for alle arter) meget ofte påviser, at andre *Legionella* arter er tilstede, og ofte i et højere antal end *L. pneumophila* (se afsnitte **Legionella spp. qPCR resultater**).



Udover at kunne vokse ved ret høje temperaturer, er *L. pneumophila* også ganske varmetolerant, og kan ofte isoleres fra vand der har langt højere temperatur end 50 °C (op til 70 °C) (Allegra, 2011), og kan i nogle tilfælde overleve i flere timer ved temperatur op til 60 °C og fortsat være dyrkbare og infektiøse. Varmetolerancen kan selekteres og opbygges hos bakterierne i et varmtvandssystem (Allegra, 2011; Harriet, 2017), og i nogle tilfælde kan *L. pneumophila* komme til at dominere frem for andre bakterier, der ikke er så varmetolerante. Generelt er *L. pneumophila* mere resistent end mange andre bakterier over for både varme- og biocid behandling. Bidragende til dette er at *Legionella* kan overleve i beskyttende amøbecyster. *Legionella* kan, hvis miljøet er ugunstigt (manglende næringsstoffer, manglende værtsorganismer, for lav temperatur, for høj temperatur eller tilstedeværelse af biocid), også overgå i en inaktiv og resistent hvilefase, hvor de heller ikke kan dyrkes på substrater (levende men ikke dyrkbar fase (såkaldt VBNC)). Men de er fortsat infektiøse over for deres naturlige værter, og ved at gennemgå deres livscyklus i en protozo kan de igen fremkomme i en dyrkbar og infektiøs form.

Alle disse forhold gør, at det rent praktisk er umuligt udrydde *L. pneumophila* i et menneskabt vandssystem, hvis de først har etableret sig. Det er til gengæld muligt at kontrollere niveauet ved korrekt drift i form af korrekte temperaturer, korrekt gennemstrømning af vand og afblænding af døde rørender mv. Biocidbehandling kan være nødvendig, og kan være et supplement til ovenstående, specielt på hospitaler, plejehjem, hoteller og offentlige bruseranlæg (badelande, sportsanlæg og pool områder). For visse anlæg som køletårne og spa-bade er biocidbehandling en forudsætning for at kontrollere niveauerne, idet de drives ved temperaturer hvor *Legionella* kan vokse.

Typning af *L. pneumophila* og *L. pneumophila* smitsomhed

L. pneumophila kan opdeles i 16 serogrupper alt efter deres reaktion med polyklonale eller monoklonale antistoffer. *L. pneumophila* serogruppe 1 er den serogruppe der er associeret med flest sygdomstilfælde, i litteraturen angives det ofte, at ca. 80 - 90% af alle tilfælde skyldes serogruppe 1 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017). For danske tilfælde er det overordnet dog kun ca. 60% af de dyrkningsverificerede tilfælde der skyldes serogruppe 1. I miljøet er serogruppe 1 generelt ikke så hyppige som andre serogrupper, og de antages derfor at være mere smitsomme (virulente). Serogruppe 1 kan imidlertid opdeles i to hovedgrupper - Pontiac og non-Pontiac grupperne - alt efter deres reaktion med et monoklonalt antistof (MAb 3/1). Pontiac gruppe omfatter subgrupperne Philadelphia, Benidorm, Knoxville og Allentown/France, mens non-Pontiac gruppe omfatter subgrupperne Bellingham, OLDA/Oxford og Camperdown. Der er ingen tvivl om, at *L. pneumophila* stammer, der tilhører Pontiac gruppen, er mere smitsomme end de andre typer, der tilhører non-Pontiac gruppen, idet stort set alle globalt registrerede udbrud (mere end ét tilfælde smittet fra samme kilde) uden for hospital er forårsaget af stammer tilhørende denne gruppe. Desuden bliver denne gruppe sjældent påvist fra diverse vandssystemer, mens stammer tilhørende non-Pontiac gruppen langt hyppigere bliver påvist. Herudover kan ellers raske og yngre personer godt smittes med stammer tilhørende Pontiac gruppen, mens stammer tilhørende non-Pontiac gruppen og andre serogrupper stort set kun smitter i forvejen svækkede personer.



Overordnet kan man sige, at det kun er stammer, der tilhører Pontiac gruppen, der har udbruds potentiale (risiko for flere smittede fra samme kilde) blandt ellers raske personer, mens alle andre grupper primært er årsag til sporadiske (enkeltstående) tilfælde. Dog kan der, for så vidt angår de sidstnævnte, forekomme udbrud blandt svække personer (hospitaller og plejehjem). Det er stadig tvivlsomt, om serogruppe 1 non-Pontiac stammer generelt er mere smitsomme end stammer tilhørende andre serogrupper, men dette studie tyder på det godt kan være tilfældet i det mindste for subgruppe OLDA/Oxford ST1 (se **Resultater** og **Diskussion**)

Der er en genetisk baggrund for opdelingen i Pontiac og non-Pontiac, idet alle Pontiac stammerne har og udtrykker genet *lag-1* (en O-acetyltransferase), der har indflydelse på opbygningen af det lipopolysaccharid (LPS), der sidder på ydersiden af bakterierne. Hvorfor og hvorledes denne specielle LPS konformation har indflydelse på smitsomheden er uklart, men antageligt har det betydning for evnen til at spredes med en aerosol eller/og evnen til at blive optaget af makrofager. En nyere undersøgelse viser også at *lag-1* kan være associeret med forøget resistens mod komplement-medieret drab (Wee, 2020). Når de er inde i humane makrofager, er de generelt ikke bedre til at formere sig end andre serogruppe 1 subgrupper og visse andre serogrupper, og sygdomsforløbet er heller ikke værre; tværtimod er dødeligheden blandt smittede med Pontiac stammer lavere end dødeligheden for de andre grupper, men det hænger sammen med, at det generelt er personer med bedre helbred, der smittes med stammer tilhørende Pontiac gruppen (herunder de rejseassocierede tilfælde), end personer der smittes med non-Pontiac og andre serogrupper. Men de egenskaber, der knytter sig til Pontiac gruppen, har tilsyneladende ingen generel fordel for dem, i det mindste er de, som nævnt, ikke er særligt udbredte i mange miljøer, herunder varmtvandssystemer. Der findes mange andre virulensassocierede gener hos *Legionella* udover *lag-1* (Khodr, 2016). Disse findes i varierende grad hos forskellige stammer indenfor alle arter og serogrupper, derfor er der heller ingen helt entydig sammenhæng mellem sub-/serogruppe og virulensen, desuden er der også forskel på smitsomheden for forskellige stammer indenfor Pontiac gruppen (se herunder), hvilket kan være associeret til forskellige varianter af *lag-1* (Kozak, 2009).

For nærmere at karakterisere *L. pneumophila* isolater og for at opnå en langt højere diskriminatorisk resultat (f.eks. til brug for epidemiologisk smitteudredning) kan isolaterne DNA typebestemmes. Der er i dag konsensus om DNA typningsmetoden Sekvens Baseret Typning (SBT) (Gaia, 2005), som kort fortalt går ud på at DNA-sekventere syv genetiske loci hos *L. pneumophila*; *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, og *neuA/neuAh*. Alt efter sekvenserne for allelerne for de syv loci får stammen tildelt en sekvenstype (ST). I dag er der næsten 3000 kendte sekvenstyper; mange er sjældne og for mange af dem er de kun fundet i et enkelt land, helt lokalt og i nogle tilfælde kun fra én enkelt patient- eller miljøprøve. Nogle sekvenstyper er derimod globale, herunder ST1 som er verdens mest udbredte ST og den type, der er mest almindelig blandt patientisolater i Danmark (ca. 25%). Typen er overvejende knyttet til serogruppe 1 subgruppe OLDA/Oxford, der som tidligere omtalt tilhører non-Pontiac gruppen. Nogle sekvenstyper i Pontiac gruppen er tilsyneladende mere smitsomme/virulente end andre (antageligt associeret til *lag-1* varianten), ST23, ST47 og ST62 er f.eks. "meget" smitsomme, og i nogle europæiske lande er det de ST, der er årsag til de fleste kliniske tilfælde, men som alligevel sjældent forekommer i miljøprøver (mærmere beskrevet i afsnit **Hvad bliver man smitte med i Danmark**). Subgruppe Philadelphia ST1 (ST1



findes som omtalt også hos OLDA/Oxford) og Benidorm ST42 er de Pontiac typer, der er hyppigste årsager til samfundssmitte i Danmark. Begge typer er påvist i vandprøver fra varmtvandssystemer i forbindelse med smitteudredning, men findes ellers sjældent.

Det er vigtigt igen at bemærke, at tæt beslægtede stammer, her eksemplificeret med ST1, kan tilhører hver sin serologiske undergruppe - Pontiac (Philadelphia) eller non-Pontiac (OLDA/Oxford) - alt efter om de har eller ikke har *lag-1* genet. For andre ST, f.eks. ST23, ST47 og ST62 (som er meget unge klonale linjer (se afsnitte **Hvad bliver man smittet med i Danmark?**)), tilhører "alle" isolater Pontiac gruppen. Pontiac/non-Pontiac (og serogruppe i det hele taget) er ikke en egentlige fylogenetisk markør, idet genet er spredt i næsten hele det fylogenetiske træ for *L. pneumophila* (Wee, 2020), men dog altid knyttet til serogruppe 1. Genet *lag-1* "nedarves" naturligvis og er dermed også klonalt spredt, men det er også spredt horisontalt (spredt mellem bakterier i tæt kontakt). Det gælder i øvrigt for mange gener (herunder virulens gener, se afsnittet ovenover) hos *Legionella*, hvor der generelt sker en høj grad af genetisk udveksling mellem stammer, med andre bakteriearter og endda også med deres eukaryote værtsceller (Khodr, 2016).

Sygdom

Ovenstående har fokuseret på legionærsygdom, men som nævnt kan *Legionella* også foårsage et andet klassisk klinisk billede, der kaldes Pontiac feber (må ikke forveksles med Pontiac gruppen), efter det første kendte udbrud i byen Pontiac i 1968. Først ca. 10 år efter fandt man årsagen til dette udbrud, da man fik karakteriseret bakterien efter det første kendte udbrud af legionærsygdom (Legionnaires' disease) i Philadelphia i 1976. Legionærsygdom, Pontiac feber og andre mere sjældne *Legionella*-infektioner kaldes under ét legionellose. Symptomerne på Pontiac feber er som ved en forholdsvis mild influenza, med høj feber, muskelsmerter, hovedpine og brystmerter. Sygdommen går over af sig selv i løbet af få dage til en uge, evt. med et lidt længere efterforløb med træthed og brystmerter. I modsætning til legionærsygdom (se afsnitte herunder) er Pontiac feber meget "smitsom" og giver symptomer, hos stort set alle der udsættes for smitten, også børn. Smittevejen er udelukkende ved indånding af en aerosol forurenede med bakterien. Smitte fra forstøvet pottemuld med *L. longbeachae* er også påvist i New Zealand (Cramp, 2010). Man kender ikke årsagen til, at *Legionella* (flere arter og serogrupper) kan give dette sygdomsbillede, men der er antageligt ikke tale om en egentlig infektion af de alveolære makrofager som ved legionærsygdom, men nærmere en immunologisk/febril reaktion på indånding af et højt antal bakterier. Sygdomsbillede er det samme, hvad enten det er *L. pneumophila* serogruppe 1, andre serogrupper eller andre arter, der er årsagen. Man kender ikke antallet af tilfælde, da sygdommen sjældent diagnosticeres, og ikke skal indberettes. Man mener at antallet af Pontiac feber tilfælde er 10 til 100 gange så højt som tilfælde af egentlig legionærsygdom. I få tilfælde kan det samme udbrud både give årsag til Pontiac feber (mange tilfælde) og legionærsygdom (få tilfælde). Diagnosen kan som regel kun stilles ved at påvise antistoffer mod *Legionella* og sker kun ved egentlige udbrud med flere syge, der har været i kontakt med den samme smitekilde (Gregersen, 1999). Legionærsygdom er derimod en alvorlig lungebetændelse med dødelig udgang for ca. 10% af de ramte. Sygdommen rammer især personer der er immunsvækkede eller har en underliggende kronisk sygdom, specielt lungesygdom. Desuden stiger den relative risiko alderen og ses meget sjældent hos personer under 30 år. Køn spiller også en rolle, idet op mod



dobbelt så mange mænd som kvinder får sygdommen. Andre faktorer, der disponerer er rygning, alkoholmisbrug, diabetes, samt udlandsrejse. Desuden ser det ud til at legionærsygdom/legionellose i sig selv kan være disponerende for at få sygdommen igen (Cassell, 2021). I modsætning til Pontiac feber er "smitsomheden" (attach rate) lille og kun ganske få personer (<5%), der udsættes for en af de mest smitsomme typer under et udbrud, bliver syge. Inkubationsperioden (fra smittetidspunkt til de første symptomer) er mellem 2 og 10 dage (i nogle få tilfælde længere), men de fleste får symptomer efter 6-7 dage. Legionærsygdom er som nævnt en alvorlig lungebetændelse. Af de diagnosticerede tilfælde kræves der hospitalsindlæggelse for næsten 100% af tilfældene, ofte er indlæggelserne lange med lange rekonvalescensperioder (i nogle tilfælde livsvarige følger). Selvom sygdommen er relativ sjælden repræsenterer den et stor negativ impact for den enkelte patient og er en økonomisk belastning for sundhedsvæsenet/samfundet.

Legionella kan også forårsage en række andre non-pneumoniske infektioner, herunder infektion i led, sår, hud (cellulitis), hjerteklapper, lymfeknuder mv. Det er dog sjældne sygdomsbilleder, der kan opstå som følge af spredning af bakterien fra lungerne, men i nogle tilfælde er der ikke en forudgående lungebetændelse.

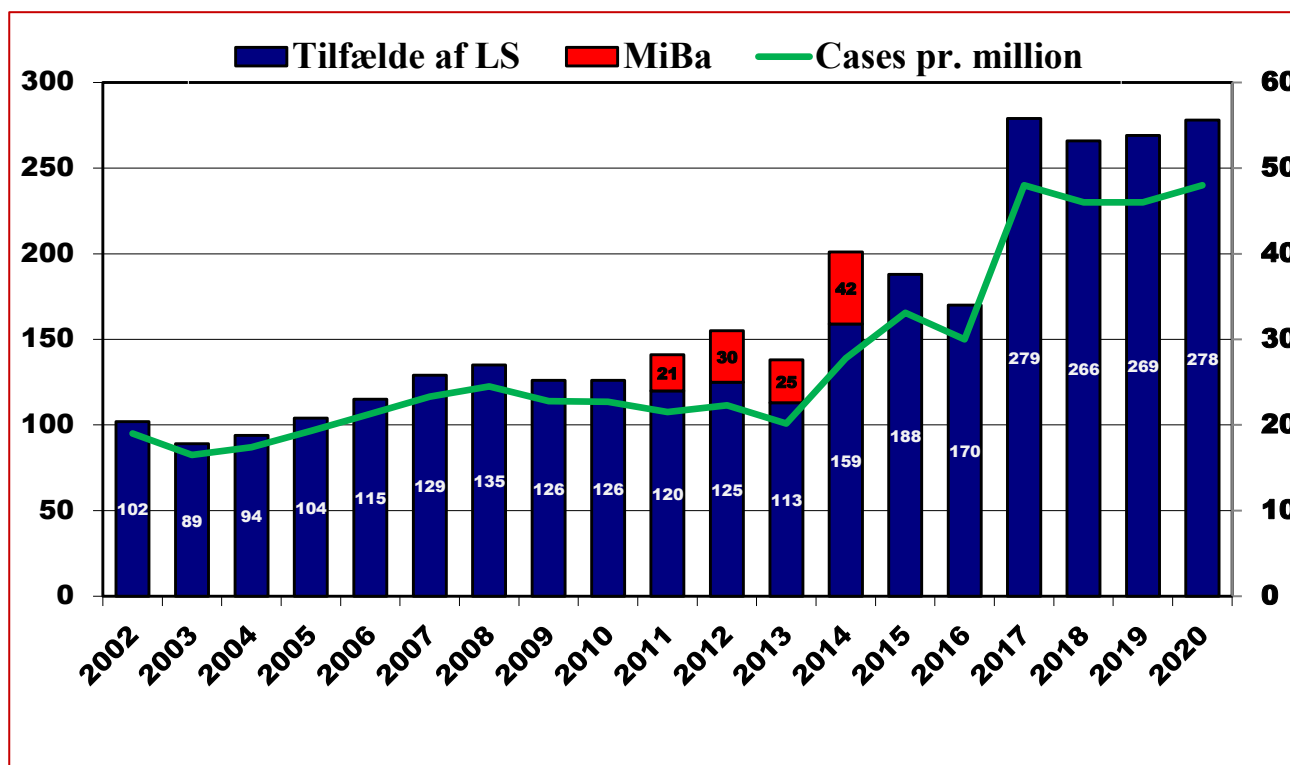
Herudover påvises/diagnosticeres en del atypiske forløb, som hverken er egentlig legionærsygdom eller Pontiac feber, men som alligevel er associeret med indlæggelse på hospital. Det ses f.eks. associeret til en forværring af en patients KOL, men uden pneumoni. Årsagen til at der påvises flere af disse tilfælde, er de meget følsomme metoder (PCR) der anvendes i dag. I 2020 var der således registreret 316 patienter med positive laboratorieresultater, mens "kun" 278 betragtes og registreres som legionærsygdom.

Legionærsygdom i Danmark

Danmark har, og har i mange år haft, Europas højeste eller en af de højest registrerede incidenser af legionærsygdom; nemlig 20–25 tilfælde pr. million indbyggere pr. år fra 2007 til 2013, omkring 30 fra 2014 til 2016 og over 45 fra 2017 til og med 2020 (figur 1). Til sammenligning har den gennemsnitlige incidens i Europa været ca. 12 tilfælde pr. million pr. år fra 2005 til 2013, og er herefter steget til ca. 23 tilfælde pr. million i 2018 og 2019. Kun Slovenien og Italien har et niveau som det Danmark har (Centers for Disease Control and Prevention, 2020 I). De seneste år er der altså set en stigning i antallet af registrerede tilfælde af legionærsygdom, både i Danmark, i mange andre Europæiske lande og i USA (Centers for Disease Control and Prevention, 2018; Cassell, 2018). Der er ikke fremkommet entydige forklaringer på de observerede stigninger, men følgende faktorer er nævnt som medvirkende årsager; en stigende ældre og modtagelige/sårbar befolkning, forbedrede overvågningssystemer, øget opmærksomhed og testaktivitet, en øget anvendelse af anlæg med vand (befugtere, køletårne mv), en aldrende boligmasse, vand- og energibesparelse, spredning af mere smitsomme typer og klimænderinger. Med hensyn til det sidste er der flere arbejder der peger på sammenhæng mellem temperaurer, regnmængde/luftfugtighed og legionærsygdom (Halsby, 2014; Beauté, 2016; Slimmering, 2017; Cassell, 2018). Sidstnævnte har sandsynligvis ikke så stor betydning i Danmark, hvor de fleste tilfælde antages at være smittet fra interne smittekilder såsom varmtvandssystemer. Hvilket også kan forklare hvorfor vi ikke i særlig høj grad ser den ellers typiske sæsonvariationer med flest tilfælde i løbet sommeren/efteråret (European Centre for



Disease Control and Prevention, 2020 II). Dog er det endnu ikke undersøgt om lokale klimatiske forhold også i Danmark kan være årsag til ændringer i sygdomshyppigheden. Lokale klimatiske forhold (høj temperatur, høj luftfugtighed og vindretning) er fundet associeret til udbrud af legionærsygdom (George, 2016).



Figur 1. Antal registrerede tilfælde med legionærsygdom (LS) pr. år (blå søjler), antal patienter med positiv legionelladiagnostik registreret i MiBa, men som ikke var anmeldt til STPS/SSI (røde søjler) og antal registrerede tilfælde pr. mio. indbyggere pr. år (grøn kurve, høje akse).

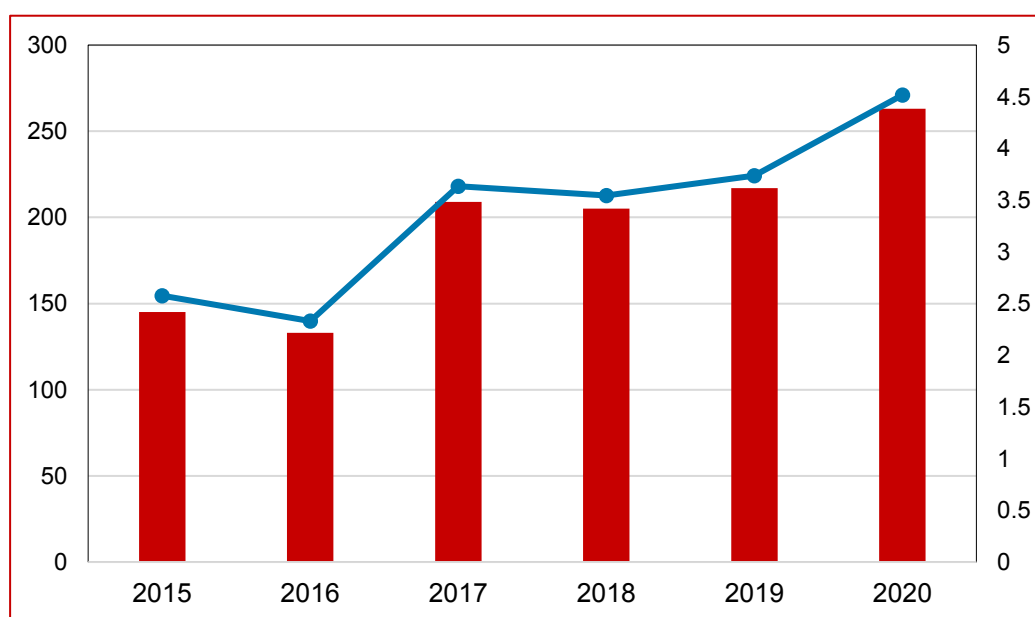
Medvirkende til den registrerede stigningen i antal tilfælde, er at overvågningen af legionærsygdom i Danmark blev intensiveret fra 2015. Legionærsygdom skal anmeldes til Styrelsen for Patientsikkerhed (STPS) og Statens Serum Institut (SSI) af behandlende læge/afdeling. Tidligere, hvor SSI udførte det meste af landets diagnostik for legionærsygdom, kunne der udbedes anmeldelse ved en konstateret positiv laboratorie-diagnose på SSI. Efter regionernes oprettelse i 2007 blev diagnostikken gradvist overtaget af regionerne, og i dag udføres der stort set ingen primær diagnostik for legionærsygdom på SSI, og der kan ikke udbedes anmeldelse på denne baggrund. Det har i en årrække betydet at en del tilfælde ikke blev anmeldt.

I 2010 blev den Danske Mikrobiologiske Database (MiBa, <https://miba.ssi.dk/mikrobiologidatabase>) oprettet på SSI. Databasen samler alle mikrobiologiske resultater fra landets Klinisk Mikrobiologiske Afdelinger (KMA) og SSI. I 2014 blev antallet af patienter med positiv *Legionella* diagnostik registreret i MiBa fra 2011 til 2014 sammenholdt med antallet af anmeldte tilfælde de samme år. Det blev fundet at mellem 15 og 20% af diagnosticerede tilfælde ikke var anmeldt (figur 1). Det er dog ikke helt det samme som, at alle MiBa tilfælde med positiv diagnostik havde



legionærsygdom (jf. tidligere kommentar om atypiske forløb), men søgekriterierne var valgt restriktivt og det antages at tæt på 100% af de manglende tilfælde havde haft legionærsygdom. Således var der sandsynligvis reelt ca. 200 tilfælde af legionærsygdom i 2014 mod 159 registrerede tilfælde (figur 1). Siden 2015 er der indført en kontrol procedure hvor der udbedes anmeldelser for ikke anmeldte diagnosticerede tilfælde registreret i MiBa. Denne nye procedure kan dog langt fra alene forklare stigningen i antal registrerede tilfælde, specielt ikke stigningen der er blev påvist fra 2015/16 til 2017, hvor overvågnings-proceduren var den samme (figur 1).

Normalt er er 22-25% af de anmeldte tilfælde erhvervet under udlandsrejse/turistrejse. I 2020 blev verden ramt af COVID -19 pandemien som medførte strenge rejserestriktioner det meste af året. I 2020 var der således kun 15 registrerede rejseassocierede tilfælde af i alt 278 tilfælde (5,4%). Da det samlede antal registrerede tilfælde stort set var det samme som de sidste tre år uden rejserestriktioner (figur 1), betyder det, at der var en betydelig stigning på ca. 25% i antal smittede i Danmark (i alt 263 tilfælde) i forhold til 2017, 18 og 19 (figur 2). Sammenlignet med 2015 og 2016 hvor der i gennemsnit var 139 tilfælde, og hvor overvågningsystemet var det samme som de følgende år, er stigningen endnu mere markant og på ca. 90% (figur 2).



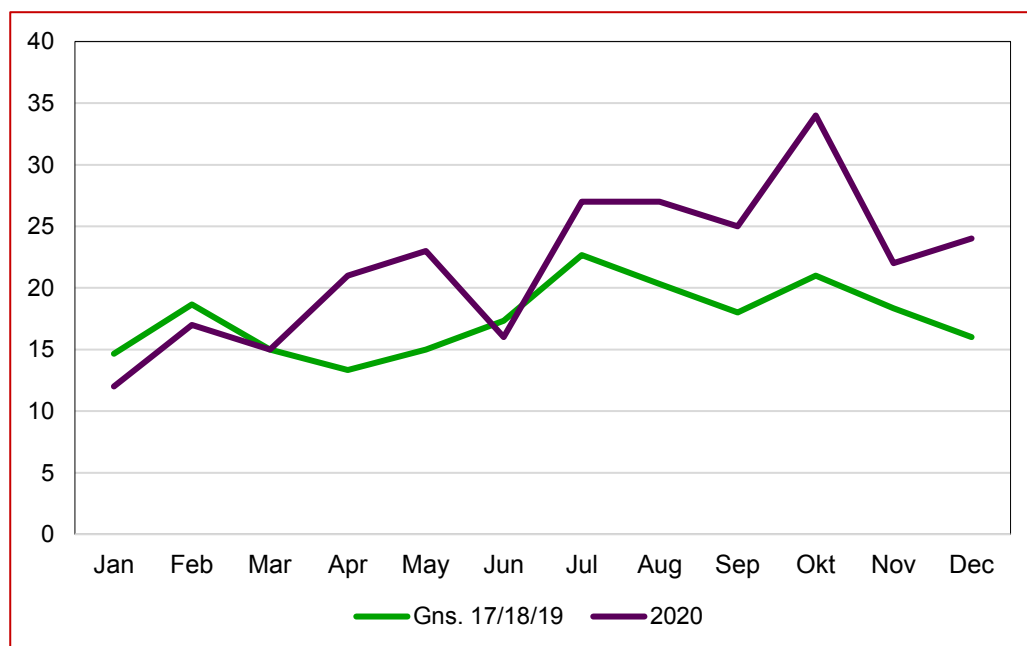
Figur 2. Antal registrerede tilfælde med legionærsygdom erhvervet i Danmark pr. år (røde søjler) og antal registrerede tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år (blå kurve, højre akse).

2020 var dog på mange måder et usædvanligt år. Mange opholdt sig mere end sædvanligt i hjemmet og mange vandanlæg på arbejdspladser, hoteller, svømmehaller, fitnesscentre m.v. var lukket ned i længere perioder eller havde betydeligt lavere vandforbrug end normalt. Disse forhold kan have medvirket til stigningen i antal tilfælde smittet i Danmark. Data fra MiBa viser dog også en betydelig stigning i antal undersøgte patienter i 2020 i forhold til 2019, hvilket kan hænge sammen med at legionærsygdom er en differentialdiagnose til alvorlig COVID-19. Stigningen skyldes eventuelt en kombination af disse forhold og er således ikke nødvendigvis en del af en



trend, men eventuelt et udsving forårsaget af usædvanlige omstændigheder. I 2020 var der specielt mange tilfælde fra juli til og med oktober (figur 3) i forhold til de tidligere tre år (grøn kurve, gennemsnit), men også april, maj og november/december lå over gennemsnittet. (se APPENDIX I for grafer og nærmere belysning af *Legionella* under COVID-19 pandemien).

Generelt er tilfælde, hvor smitte er sket i Danmark, ret jævnt fordelt over året (grøn kurve, figur 3), hvor der i Europa generelt ser noget større sæson udsving, således at langt de fleste tilfælde ses fra juni til oktober/november, og færrest tilfælde fra december til og med maj (European Centre for Disease Control and Prevention, 2020). Dette er i nogen grad associeret med rejsesæsonen sommer/efterår, men menes også at være associeret til, at *L. pneumophila* er en bakterie, der kræver ret høje temperaturer, og derfor ofte vil have de bedste vækstmuligheder i løbet af sommeren i mange miljøer hvor høj luftfugtighed også kan være med til at sprede bakterien. I Danmark kan sænkninger af fjernvarmetemperaturer om sommeren evt. være medvirkende årsag til den lille stigning man normalt ser i løbet af sommeren/efteråret.



Figur 3. Antal registrerede tilfælde af legionærsygdom erhvervet i Danmark pr. måned i 2020 (lilla kurve) og gennemsnitligt antal registrerede tilfælde pr. måned i 2017, 18 og 19 (grøn kurve).

Hvor bliver man smittet i Danmark?

Vi antager fortsat, at de fleste bliver smittet fra vandsystemer i eget hjem. Men smitte er også dokumenteret fra arbejdspladser, svømmehaller, vandlande og hoteller. Smittekilden kan i langt de fleste tilfælde spores til brusebadsanlæg. Herudover er der nosokomielle (hospitalserhvervede) tilfælde og tilfælde erhvervet på andre institution inden for sundhedsvæsenet (f.eks. plejecentre). Tilsammen har hospitaler og plejecentre udgjort ca. 10% af alle tilfælde de senere år. Disse tilfælde skyldes sandsynligvis også i de fleste tilfælde "forurenede" vand i brusebade, men for nogle få tilfælde har fejlsynkning (aspiration) også været en sandsynlig smittevej.

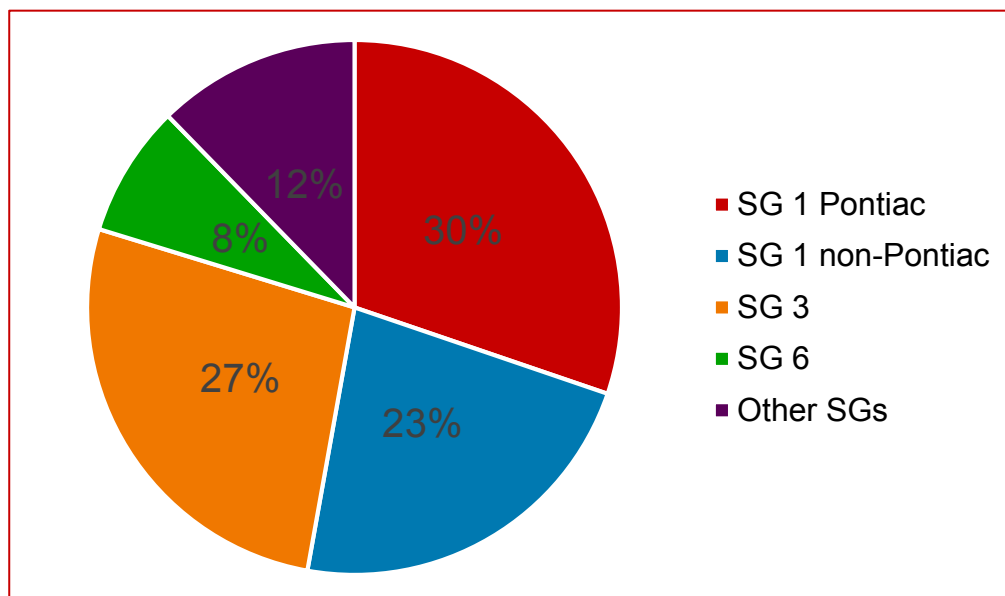


Alle anmeldte tilfælde af legionærsygdom kontaktes af Styrelsen for Patientsikkerhed (STPS), og på foranledning af STPS udføres der hvert år en del smitteudredninger med vandprøvetagning. Dette sker dog langt fra for alle patienter, dels fordi kommunen ikke giver påbud om det (kommunen er myndighed) og dels fordi mange tilfælde anmeldes sent, hvorfor det ikke længere er aktuelt. Desuden bliver mange enfamiliehuse ikke undersøgt, da det er op til ejeren selv at stå for det. Herudover er det ikke alle smitteudredninger SSI får kendskab til (der er ikke indberetningspligt). På baggrund af oplysning i de skriftlige anmeldelser og oplysninger opnået ved interview, inddeles patienterne i tre hovedgrupper – samfundserhvervet, erhvervet i sundhedsvæsnet og erhvervet under udlandsrejse. Herudover er der hvert år ca. 6% med ukendt smittekategori som henregnes til smittet i Danmark.

I årene 2017 til 2019 blev i alt 500 tilfælde henregnet til gruppen samfundserhvervet smitte. Af disse har SSI kendskab til smitteudredning for 109 tilfælde. Da patienterne i overvejende grad har opholdt sig i hjemmet i inkubationsperioden, er det oftest kun hjemmets vandforsyning, der undersøges. I 104 tilfælde blev der påvist *Legionella* (95,4%) i den mistænkte vandforsyning, men kun for de tilfælde hvor der foreligger et patientisolat, kan der undersøges for, om der er match mellem patient- og miljøisolater og dermed sandsynliggøre smitekilden (se afsnittet **Typning af *L. pneumophila* og *L. pneumophila* smitsomhed**). Af de 109 tilfælde var der kun patientisolater for de 67. I 39 af disse tilfælde blev der fundet et match med miljøisolater, for 35 af de 39 var der match mellem patient- og miljøisolater fra vandforsyningen i patientens hjem. Det betyder, at selvom der påvises *Legionella* i den mistænkte smittekilde, er det kun i 58% (39 af 67) af tilfældene at der blev påvist et egentligt match. For de resterende 42% forbliver smitekilden uafklaret. *Dette kan betyde, at smitekilden i op mod halvdelen af tilfældene ikke er hjemmets vandforsyning, og at alternative smitteveje/smittekilder bør overvejes* (Euser, 2013). De undersøgte vandforsyninger er i overvejende grad større systemer i boligblokke, men en del af patienterne med legionærsygdom bor i mindre boliger (enfamiliehuse), der som nævnt sjældnere danner baggrund for undersøgelser (se endvidere særskilt **BBR undersøgelse af fordelingen af boligformer for legionellatilfælde**).

Hvad bliver man smittet med i Danmark?

Det er ret forskellige typer af *L. pneumophila*, der dominerer indenfor de tre hovedgrupper af smittekategori for legionærsygdom; samfunds-, sygehus/institutions- og udlandserhvervet legionærsygdom. Den mest markant forskel ses for udlandssmittede, hvor den mest smitsomme serogruppe 1 Pontiac udgør ca. 80%, af tilfældene, mens den kun ses hos ca. 7% af de sygehus-/institutions smittede og ca. 30% af de samfundssmittede. I figur 4 er serogruppe-fordelingen vist for de samfundssmittede (dyrkningsverificerede) tilfælde fra 2015 til 2019 (301 tilfælde). De fleste tilfælde (ca. 70%), der smittes i Danmark udenfor sundhedsvæsnet, var således smittet med mindre smitsomme typer end serogruppe 1 Pontiac. Den overordnede serogruppe-/typefordelingen er ret stabil fra år til år (figur 5), og der er intet der tyder på at stigningen i antal legionellatilfælde kan tilskrives introduktion af mere smitsomme/virulente typer (se afsnittet **Typning af *L. pneumophila* og *L. pneumophila* smitsomhed** og herunder).

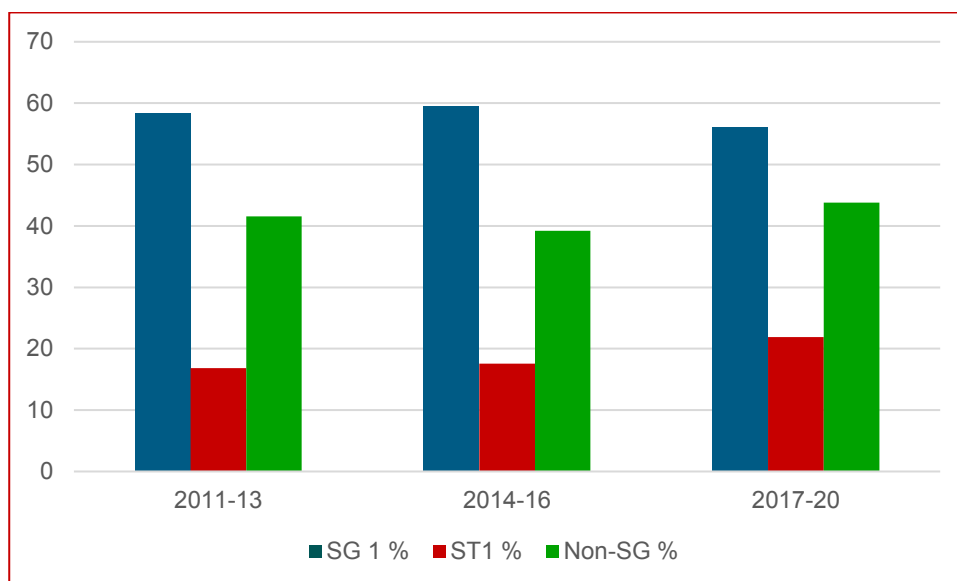


Figur 4. Fordeling af *L. pneumophila* serogrupper for isolater fra patienter med legionærsygdom hvor der har været samfundssmitte, fra 2015 til 2019 (301 isolater).

Heller ikke stigningen i 2020 ser ud til hænge sammen med mere smitsomme typer, idet andelen af Pontiac i 2020 var 31,5%, mens gruppe non-Pontiac udgjorde 29,3%, altså meget lig ovenstående fordeling (figur 4). Se i øvrigt Legionella årsopgørelser fra SSI (Legionella årsopgørelse 2018, 2019 og 2020).

Fra udlandet rapporteres om en meget anderledes fordeling, idet langt de fleste tilfælde (> 70%) skyldes de mest smitsomme typer tilhørende gruppen Pontiac. Der er flere mulige forklaringer på dette, som vil blive omtalt i afsnittet **Generel Diskussion og Konklusion**.

ST1 isoleres er som nævnt hyppigst fra tilfælde smittet i Danmark (ca. 25%), og er ret almindelig blandt hospitals- og institutionserhvervede tilfælde. Denne ST dominerer kraftigt blandt non-Pontiac tilfældene (subgruppe OLDA/Oxford) men er også den hyppigste ST blandt Pontiac gruppen (subgruppe Philadelphia). ST1 er som nævnt en global type og i nogle lande/områder den dominerende type, f.eks. i USA hvor ST1 ligesom i Danmark er den hyppigst isolerede ST (23%) fra patienter (Kozak-Muiznieks, 2012). Typen udgør en speciel udfordring, da den genetiske variation er lille (vanskeliggør smitteudredning ved molekylær typning), og findes på mange sygehuse og i relativt mange vandsystemer. Den påvises relativt hyppigt ved patient smitteudredninger, mens den generelle forekomst i miljøet (varmvandssystemer) i Danmark er ukendt. Det antages at klonen er opstået i midten af 1800 tallet og hurtigt har spredt sig globalt siden 1940'erne (David 2016).



Figur 4. Procentvis fordeling af *L. pneumophila* serogruppe 1, *L. pneumophila* serogruppe 1 ST1 og *L. pneumophila* non-serogruppe 1 isolater fra patienter med samfundssmitte, opgjort for tre perioder – med lav- (2011-2013), intermediær- (2014-2016) og høj incidens. Det ses at fordelingen stort set er uændret trods store variationer i incidensen i perioderne (figur 1).

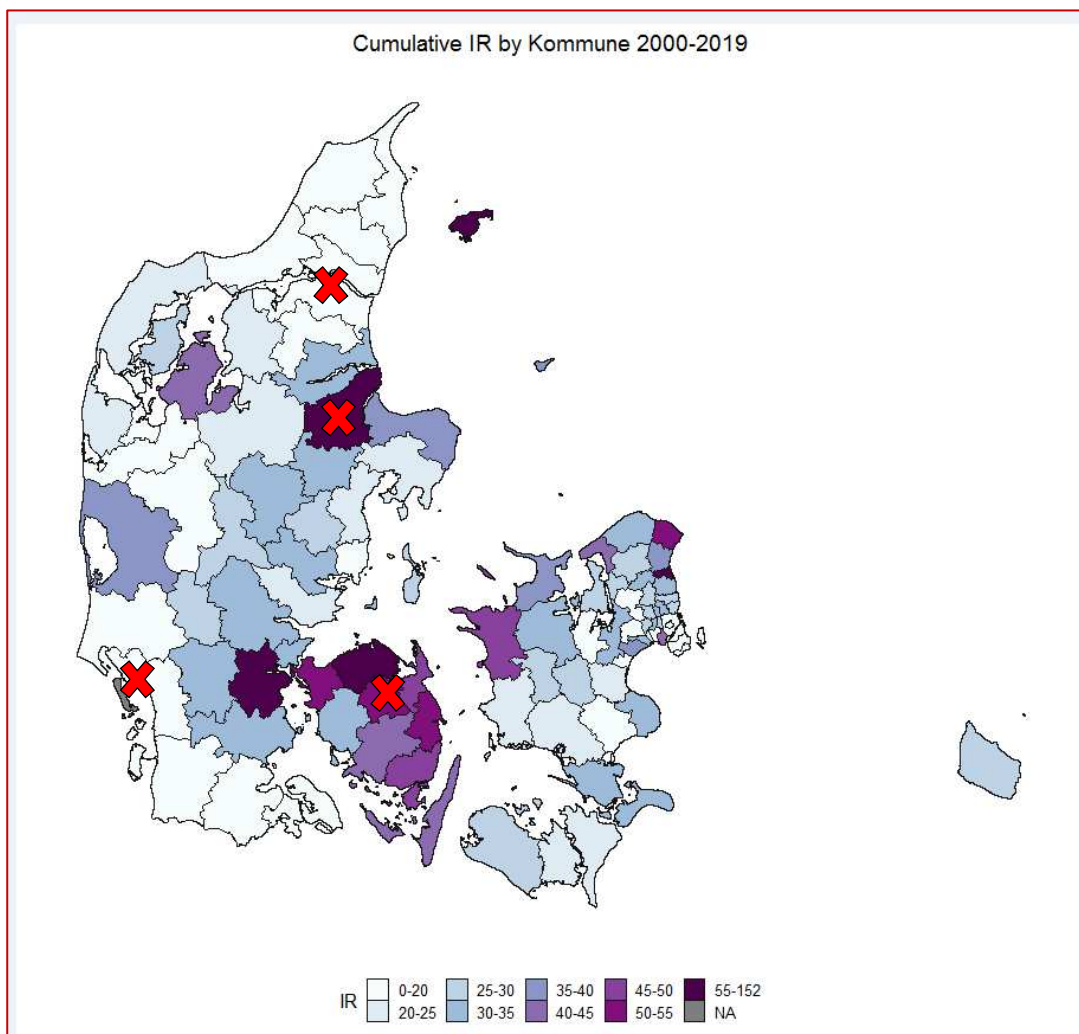
Andre hyppige sygdomsassocierede kloner (sekvenstyper) med højere smitsomhed er som nævnt ST47, ST23 og ST62 (alle tilhørende Pontiac). De er alle opstået for nyligt (hhv. 1998/2002, 1972/82 og 1943/74) og har derefter spredt sig (David, 2016). De udmærker sig ved lille genetisk variation, at være sjældne i miljøprøver (i modsætning til ST1) (Harrison, 2009; Euser, 2013; Cassier, 2014, David, 2016), og ikke at være så globalt udbredt som ST1, men i nogle lande er de hyppige eller de hyppigste årsager til legionærsygdom. ST23, ST47 og ST62 er f.eks. henholdsvis de hyppigste årsager til legionærsygdom i Frankrig (Cassier, 2014), UK/Holland (Harrison; 2009; Euser, 2013) og Tjekkiet (Drasar V., personlig kommunikation 2020). I Danmark er ST23 aldrig påvist blandt tilfælde smittet i Danmark; for de to øvrige ST er der påvist meget få tilfælde; for ST62 er der ganske få tilfælde fra 2017, 18, 19 og 20, og tidligere kun ét tilfælde fra 2014; og for ST47 er der kun påvist smitte i Danmark i 2017, 18 og 19. Spredning og introduktion af disse kloner kan være medårsag til en stigende incidens af legionærsygdom, og kan øge risikoen for udbrud med flere tilfælde, så det er vigtigt at holde øje med dem. I Danmark har vi stort set ikke set udbrud, og næsten alle tilfælde (>98%) har været sporadiske. De få samfundserhvervede udbrud (med få tilfælde) vi har set, har være knyttet til boligblokke (Krøjgaard, 2011), vandlande, svømmehaller eller hoteller (bruseranlæg). I alle tilfælde har der været tale om stammer tilhørende Pontiac gruppen (Philadelphia ST1 eller Benidorm ST42). Desuden sås et større samfunds-udbrud i Odense-området i slutningen af 2015 og begyndelsen af 2016, hvor ni tilfælde blev diagnosticeret med *L. pneumophila* serogruppe 1 subgruppe Knoxville ST9 (Legionella-pneumoni 2015, 2016). Udbruddet omfattede flere end de ni dyrkningspåviste tilfælde. Kilden til udbruddet blev ikke påvist, men var sandsynligvis én eller flere eksterne kilder (sandsynligvis køletårn). I ingen af vandprøverne fra patienternes hjem blev der påvist Knoxville ST9, og den er i det hele taget aldrig påvist i vandprøver i Danmark.



De hyppigst kliniske sekvenstype for dansksmittede efter ST1 er ST87 (ca. 13%) og ST93 (ca. 5%), begge tilhører (i overvejende grad) serogruppe 3. En lang række ST er sjældne og er kun fundet i få eller kun hos enkelte patienter. Nogle ST er relativt almindelige i miljøet, men kun sjældent påvist hos patienter.

Geografisk fordeling af legionærsygdom i Danmark

Dette bliver nærmere behandlet i en særskilt rapport (Projekt 1 fra beslutningsgrundlaget for tværfaglig arbejdsgruppe om *Legionella*). Der er betydelig forskelle på hvor høj den registrerede incidens af legionærsygdom er mellem kommuner, landsdele og regioner i Danmark. I figur 6 (udarbejdet af Kelsie Cassell, 2019) er alle tilfælde af legionærsygdom med samfundssmitte fra 2000 til 2019 geokodet på bopælskommune (godt 2000 tilfælde), incidensraten (IR) er beregnet ud fra populationen i 2010 i de enkelte kommuner. Det vil f.eks. sige at en IR mellem 50 og 55 betyder at der er påvist mellem 50 og 55 tilfælde pr. 100.000 indbyggere i de 20 år (2,5-2,75 tilfælde pr. 100.000 pr. år). Der er 5-10 ganges forskel mellem de områder med laveste og højeste registrerede incidenser. Kommuner i Nordjylland, og flere i Vest- og Sønderjylland samt København, Frederiksberg, Tårnby og Dragør har haft landets laveste incidenser, mens Fyns kommuner generelt samt Randers og Kolding i det vestlige Jylland har haft landets højeste incidenser. De røde kryds er byer, der er udvalgt til vandprøvning i Projekt 2 - vandprøver



Figur 6. Alle registrerede tilfælde af samfundserhvervet legionærsygdom fra 2000 til 2019 er geokodet efter bopælskommune og incidensen beregnet i forhold til indbyggertal i 2010 og angivet som IR antal tilfælde pr. 100.000 pr 20 år. Byer med rødt kryds er udvalgt til vandprøvetagning, se Projekt 2 – vandprøver (figur udarbejdet af Kelsie Cassell, 2019).



PROJEKT 2 – VANDPRØVER

Formål

Med dette projekt ønsker vi at være med til at afklare følgende:

1. Skyldes den høje incidens af legionærsygdom vi påviser i Danmark, sammenlignet med de fleste andre lande, at vi har en høj rate af koloniserede varmtvandssystemer?
2. Skyldes de store forskelle i incidensen mellem kommuner og områder i Danmark, at der er forskelle i kolonisationsraten, niveauer af *Legionella* (cfu/L) eller/og forekomsten af smitsomme typer?
3. Hvad er niveauerne af *L. pneumophila* (cfu/L) når varmtvandssystemer udvælges tilfældigt uden kendskab til om der har været tilfælde af legionærsygdom knyttet til dem? Denne viden kan bidrage til en national risikovurdering og til at fastlægge kommende reaktionsniveauer.
4. Hvilke typer af *Legionella* (serogrupper/subgrupper og sekvenstyper) findes der i varmtvandssystemer, når de udvælges tilfældigt uden kendskab til om der har været tilfælde af legionærsygdom knyttet til dem? Dette er viden der kan jf. ovenstående bidrage til en national risikovurdering.
5. Selvom projektet ikke går i dybden med at afklare årsager til eventuel høj grad af kolonisering eller høje niveauer af *L. pneumophila*, sammenholdes resultaterne med varmtvandstemperatur, typen af varmtvandssystem (fjernvarme, veksler eller beholder løsning) og ejendommenes alder og størrelse.
6. Fra hver anden varmtvandssystem udføres der kvantitativ qPCR ved påvisning af *L. pneumophila* serogruppe 1, *L. pneumophila*, og *Legionella* arter (spp.). Disse resultater sammenholdes med dyrkningsresultater for at vurdere om, og i hvilken grad, resultaterne korrelerer, og om qPCR kan bruges som alternativ/supplement til dyrkning. Fordelen ved denne metoden er, at den giver langt hurtigere resultater end kvantitativ dyrkning.
7. Vi håber på, at resultaterne kan bidrage til at forklare Danmarks høje incidens, forskelle i incidensen mellem kommuner og landsdele og hermed bidrage til at kunne pege på mulige årsager til den stigende incidens.

Materialer og Metoder

I dette projekt blev der dels udvalgt byer med høj incidens - Odense og Randers - og dels byer med lav incidens - Aalborg og Esbjerg (se figur 6 – byer med rødt kryds). Vandprøverne blev udtaget fra byområder, og vil ikke kunne sige noget om, hvordan det ser ud udenfor disse områder, det er naturligvis en begrænsning, som er vigtig at have in mente, når der overordnet skal konkluderes på resultaterne, idet incidensen af legionærsygdom relativt til indbyggertallet kan være lige så høj på landet (eller højere) som i byerne.

Fra byerne blev der i samarbejde med boligselskaberne udvalgt 24 - 30 ejendomme i hver by. I alt blev der taget prøver fra 104 ejendomme. Ejendomme skulle være nogenlunde sammenlignelige og har generelt mere end 10 lejligheder knyttet til hvert



anlæg. Der blev valgt både nyere og ældre ejendomme og ejendomme spredt over hele byen. Prøverne blev udtaget af samme prøvetager over en relativt kort periode, således at variabler som følge af forskellig prøvetagning og sæson blev så små som mulige. Prøverne blev så vidt muligt taget fra fjerneste tapsted (i forhold til veksler eller varmtvandsbeholder (VVB)). Rent praktisk har det dog ikke været muligt i alle tilfælde. Der blev taget A (straks prøver) og B prøver (flush-prøve) fra hvert tapsted, som i alle tilfælde var en vandhane og så vidt muligt fra badeværelse eller alternativt fra køkken. Hver prøve bestod af en liter vand. B prøven blev taget efter 1 minut hvor temperaturen også blev målt. Ét minut er valgt for at have en standardiseret prøvetagning, og da varmt vand ≥ 50 °C i henhold til vejledninger/standarder (European Standard EN 806-2, 2005; Health and Safety Executive, 2014; Lee, 2017) bør kunne opnås på mindre end ét minut. I det danske Bygningsreglement (BR 18), er der angivet retningslinjer for rørlængde og rørdiameter, der skulle sikre varmt vand (mindst 50 °C) langt hurtigere end efter ét minut.

Vandprøverne blev udtaget i løbet af sommeren/efteråret 2020, som følgende:

- 24 anlæg fra Randers fra d. 29.06.20 (uge 27)
- 25 anlæg fra Aalborg fra d. 13.07.20 (uge 29)
- 25 anlæg fra Esbjerg fra d. 17.08.20 (uge 34)
- 30 anlæg fra Odense fra d. 21.09.20 (uge 39)

I månederne juli til september var der på landsplan lige høj forekomst af legionærsygdom i Danmark (figur 3), så ud fra den betragtning, antages det ikke at have haft stor betydning at prøvetagningen var spredt over 3 måneder.

Prøverne blev sendt til SSI og sat i analyse indenfor 24 timer. Prøverne blev dyrket i henhold til standardmetode ISO 11731:2017 og resultatet er angivet som koloni dannende enheder pr. liter (cfu/L), metoden har en detektionsgrænse på 10 cfu/L (for en liter prøvevolumen), men påvisning er ikke sikker ved tilstedeværelse af < 100 cfu/L i prøven. qPCR blev udført med en in-house metode valideret efter standarden ISO/TS 12896:2012. Metoden er ikke akkrediteret. Resultaterne er angivet som genom enheder pr. liter (GU/L), metoden har en detektionsgrænse på 500 GU/L.

Alle prøver blev dyrket, mens ca. halvdelen (A og B prøver fra hver anden ejendom) også blev undersøgt ved qPCR. De prøver, der både skulle undersøges ved dyrkning og qPCR, blev rystet og delt i to, således at der for disse prøver blev undersøgt $\frac{1}{2}$ liter ved begge metoder. For hver prøve med vækst blev mindst 3 af kolonierne undersøgt for, om de tilhørte serogruppe 1, serogruppe 2-14 eller *Legionella* art (begrænset serogruppebestemmelse ved OXOID Legionella Latex Test). For anlæg med vækst, blev der undersøgt 0-3 kolonier (dog helt overvejende mindst én koloni) ved endelig sero-/subgruppe bestemmelse (med Dresden panelet af monoklonale antistoffer). Ved påvisning af serogruppe 1 med Oxoid Latex Test blev der i alle tilfælde udført subgruppebestemmelse. Der blev udført helgenomsekventering (WGS) på i princippet mindst et isolat fra hvert anlæg med vækst (et isolat med kendt sero-/subgruppe). Sekvenstypen (ST) blev efterfølgende bestemt ud fra helgenomsekvensen. Det var dog sådan at hvis samme serogruppe blev fundet i flere ejendomme i samme by, blev der ikke udført WGS/ST for alle dyrkningspositive ejendomme.

Udvælgelse af ejendomme (i samarbejde med boligselskaberne) samt prøveudtagning blev foretaget af CheckPoint World v. Lars Grøn Schjoldager. For hvert sted blev



temperaturen målt efter et minut (B prøve) og registreret, desuden blev antal lejligheder, boligens alder og typen af varmtvandssystemet registreret af Lars Grøn Schjoldager.

Resultater for dyrkning blev rapporteret inden for normal procestid (7-10 dage) til Lars Grøn Schjoldager, som videregav resultaterne til de involverede boligselskaber. Ved fund af forhøjet niveau ≥ 10.000 cfu/L blev selskabet tilbudt rådgivning.

Resultater for udvidet serogruppebestemmelse, sekvens-type og qPCR resultater er ikke rapporteret til boligselskaberne.

Resultater

Overordnede resultater – dyrkning

- 86 af de 104 anlæg var positive for dyrkbare *Legionella* (83%).
- 40% af A prøver og 24% af B prøver havde et højt niveau på ≥ 10.000 cfu/L.
- Medianværdien for A prøver var 6.000 cfu/L og 1.200 cfu/L for B prøver for alle anlæg.
- Der blev ikke påvist anlæg der var positive for *L. pneumophila* serogruppe 1 tilhørende Pontiac gruppen.
- I 10 af de 104 anlæg blev der påvist serogruppe 1 non-Pontiac (9,6%). Af de dyrkningspositive anlæg 11,6% (10 af 86).
- I 30 af de 104 anlæg blev der påvist serogruppe 3 (29%). Af de dyrkningspositive anlæg er det 34,9 %. Serogruppe 3 var den hyppigst påviste serogruppe. Antallet af anlæg med serogruppe 3 var givet noget højere end påvist, idet der generelt kun blev valgt én koloni fra hvert anlæg til endelige serogruppebestemmelse, og der i hver vandprøve/anlæg kan være flere stammer/serogrupper.
- I alt blev der påvist 10 forskellige *L. pneumophila* sero-/subgrupper samt fem kolonier af *L. pneumophila* der ikke kunne henføres til serogruppe. Herudover blev der påvist tre andre arter; *L. londiniensis*, *L. bozemanii* og *L. anisa*.
- I alt blev der påvist 27 forskellige sekvenstyper (ST).
- *Legionella* dyrkning og qPCR for *L. pneumophila* viste en rimelig god overensstemmelse med en korrelationskoefficient $R^2=0,6$.

Sammenhæng mellem temperatur og cfu/L

I figur 7A og B vises sammenhængen mellem temperaturen målt efter et minut og niveauet af *Legionella* (cfu/L), dels for A prøver og dels for B prøver. CfU/L er angivet på en logaritmisk akse (7A). For prøver uden vækst (0) er værdien angivet som 1 for A prøver og 1,5 for B prøver. Dette er gjort for dels at kunne vises dem i et logaritmisk diagram og dels for at kunne adskille A og B prøver uden vækst. Nogle punkter kan overlappende. Som forventet ligger det generelle niveau for A prøver højere end for B prøver. Både for A og B prøver er der en vis sammenhæng mellem temperatur og cfu/L (faldende koncentration af dyrkbare *Legionella* ved stigende temperatur), ved lineær



regressions analyse er sammenhængen påvist at være signifikant, og som forventet en stærkere association for B prøver end for A prøver (A prøver $p = 0,0447$ og B prøver $p = 0,0217$) (figur 7B). En del B prøver har dog >1.000 cfu/L og endda > 10.000 cfu/L, selvom temperaturen efter 1. minut er > 50 °C. Ved temperatur over 55 °C har alle B prøver dog < 1.000 cfu/L (men der er tale om ret få målinger fra fem anlæg i alt). Selv ved driftstemperaturer > 50 °C kan A prøver have et meget højt niveau af *Legionella* >100.000 cfu/L, og generelt må det vurderes at alene måling af driftstemperaturen efter et minut ikke er en god indikator for, om et anlæg er koloniseret med dyrkbare *Legionella*.

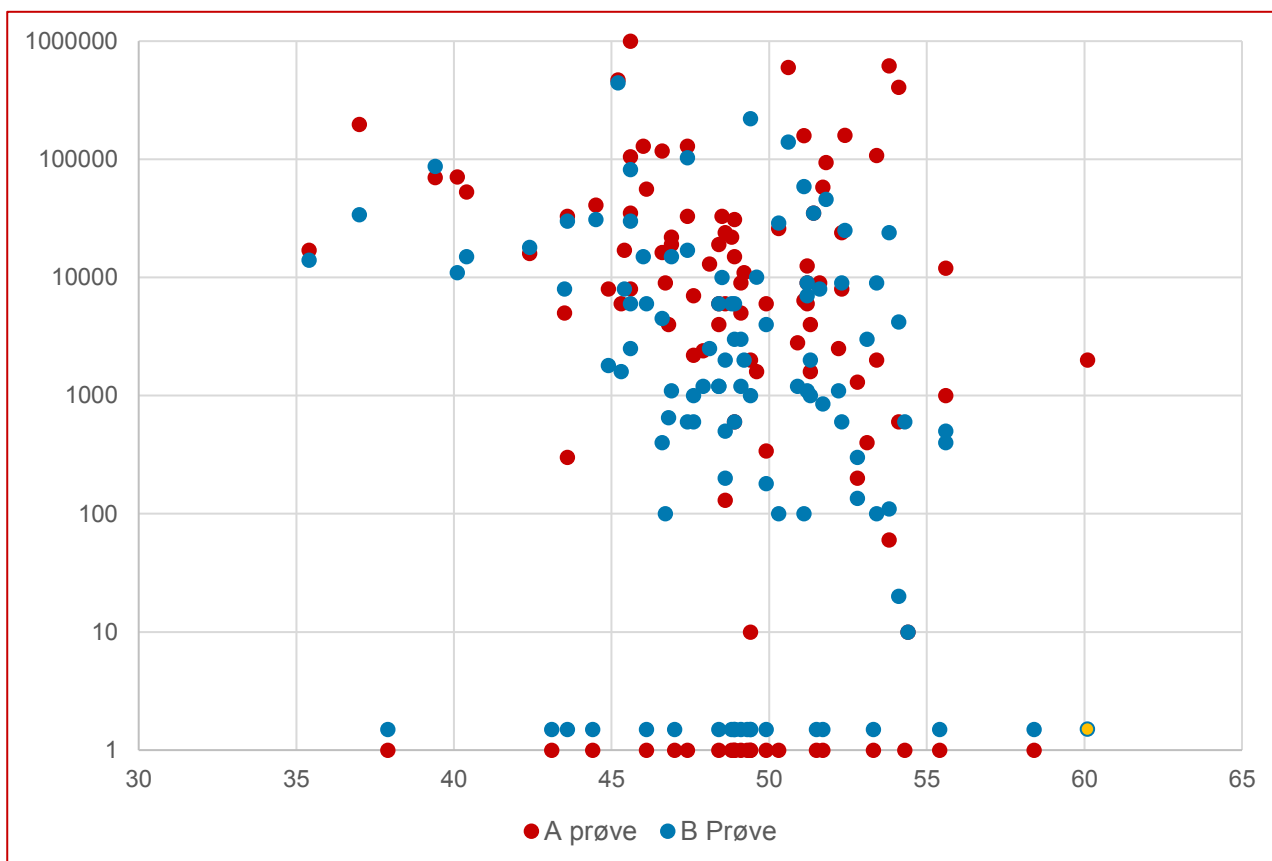
Der var et interessant anlæg, hvor der blev målt en temperatur på $60,1$ °C, og hvor der var 2.000 cfu/L i A prøven, mens B prøven var negativ (ingen vækst, orange punkt, figur 7A). Ved qPCR var både A og B prøverne kraftigt positive på hhv. 152.200 og 91.600 *L. pneumophila* GU/L (se figur 13 og 14). Dette tyder på en nuværende eller tidligere kraftig kolonisering af anlægget, men at *Legionella* i prøverne hovedsageligt ikke var dyrkbare (se afsnittet **Legionella forekomst og levevis**) eller døde. Dette er et eksempel på de meget divergerende resultater, man kan få for dyrkning og qPCR, og at hver analyse hver især kan præsentere en del af "sandheden" (se afsnittet **Sammenhæng mellem temperatur og GU/L for *L. pneumophila* for B prøver** og figur 13).

En negativ eller svagt positiv (≤ 1.000 cfu/L) A prøve er en god prædikator for, at B prøven også er negativ/svagt positiv, og at anlægget sandsynligvis ikke er eller kun er let koloniseret. For 22 anlæg uden vækst og for 11 anlæg med mellem 10 og ≤ 1.000 cfu/L for A prøver, var B prøver negative for 20 anlæg, og for 11 var der mellem 10 og ≤ 1.000 cfu/L. Kun for et af de 33 anlæg blev der påvist 3.000 cfu/L i B prøven. En del anlæg var negative både for A og B prøver, til trods for at driftstemperaturen var < 50 °C. Der er således ikke nødvendigvis et *Legionella* problem, selvom driftstemperaturene er lave (figur 7).

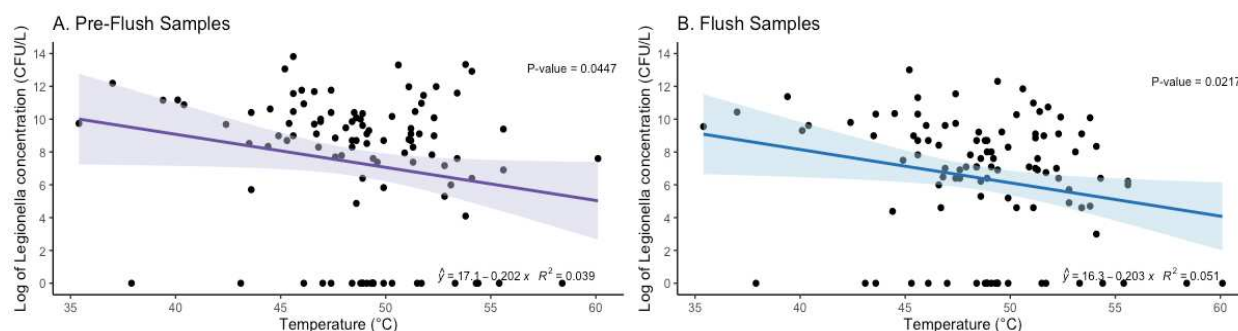
Middel-, maximum- og minimumtemperaturerne for hver by var som følger (også angivet i tabel 4):

- Randers $50,8$ °C; $55,6$ °C; $44,5$ °C - 14 anlæg ≥ 50 °C (58 % af anlæg)
- Aalborg $48,1$ °C; $60,1$ °C; $37,9$ °C - 5 anlæg ≥ 50 °C (20 % af anlæg)
- Esbjerg $48,5$ °C; $54,4$ °C; $37,0$ °C - 6 anlæg ≥ 50 °C (24 % af anlæg)
- Odense $48,5$ °C; $58,4$ °C; $35,4$ °C - 12 anlæg ≥ 50 °C (40 % af anlæg)

Overordnet var temperaturen < 50 °C for 63,5% af anlæggene, dog havde 85,6% af anlæggene en temperatur > 45 °C, hvilket for langt de fleste *Legionella* typer er over deres væksttemperatur, men dog en temperatur de let kan overlever. Der er ikke de store forskelle mellem byerne. Randers var dog den by, hvor de anbefalede temperaturer ≥ 50 °C i højeste grad blev overholdt, og Aalborg var den by hvor de blev overholdt i ringeste grad. Det blev ikke målt, hvor længe vandet skulle løbe, før stabil temperatur blev opnået, og for nogle anlæg kunne der ved forlænget flush eventuelt opnås højere temperaturer end de målte.



Figur 7A. Sammenhæng mellem målte temperaturer (°C) efter 1 min. og cfu/L for de 104 anlæg fra Randers, Odense, Aalborg og Esbjerg. Ingen vækst for A prøver er angivet som 1 og som 1,5 for B prøver.



Figur 7B. Lineær regressions analyse af sammenhæng mellem temperaturer (°C) efter 1. min og cfu/L for de 104 anlæg fra Randers, Odense, Aalborg og Esbjerg. Pre-Flush = A prøver, Flush = B prøver.



Dyrkningsresultater for de 4 byer

I tabel 1 er følgende opgjort:

- Andelen (%) af anlæg der var positive for *Legionella* ved dyrkning
- Spændvidde (cfu/L) for A og B prøver
- Medianværdien (cfu/L) for A og B prøver (se også figur 8)
- Middelværdien (cfu/L) for A og B prøver (se også figur 9)

I de tilfælde, hvor der er et lige antal anlæg, er medianen taget som gennemsnittet af de to midterste værdier. Medianværdien er den værdi, der giver mest information. F.eks. skyldes den meget høje middelværdi for B prøver fra Randers (tabel 1 og figur 9) en enkelt meget positiv B prøve (845.400 cfu/L) (tabel 1), og da niveauerne ikke er normalfordelte frembringer gennemsnittet ikke meget brugbar information. Medianværdierne for Odense lå en del højere end for de andre byer (tabel 1 og figur 8). Det er interessant at specielt medianen for A for prøver fra Odense er langt højere end for de andre byer. Andelen af anlæg koloniseret med dyrkbare *Legionella* var højest i Randers (87,5%) og Odense (83,3%) og lavest i Esbjerg (72%) (tabel 1). Overordnet var 22 A prøver (21,2%) og 21 B prøver (20,2%) negative ved dyrkning (i praksis <100 cfu/L).

Tabel 1. Andel af anlæg med vækst af *Legionella* samt spændvidder, medianer og middelværdier for A og B prøver fra de fire undersøgte byer.

By	Positiv andel %	Spændvidde A prøver CfU/L	Spændvidde B prøver CfU/L	Median A prøver CfU/L	Median B prøver CfU/L	Middelværdi A prøver CfU/L	Middelværdi B prøver CfU/L
Randers	(21/24) 87,5%	0 til 617.000	0 til 843.400	5.260	1.550	44.709	45.051
Odense	(25/30) 83,3%	0 til 470.000	0 til 444.000	14.500	2.150	55.425	26.667
Aalborg	(19/25) 76%	0 til 1.000.000	0 til 82.000	5.500	1.200	56.144	6.860
Esbjerg	(18/25) 72%	0 til 600.000	0 til 140.000	1.600	1.000	45.655	10.353

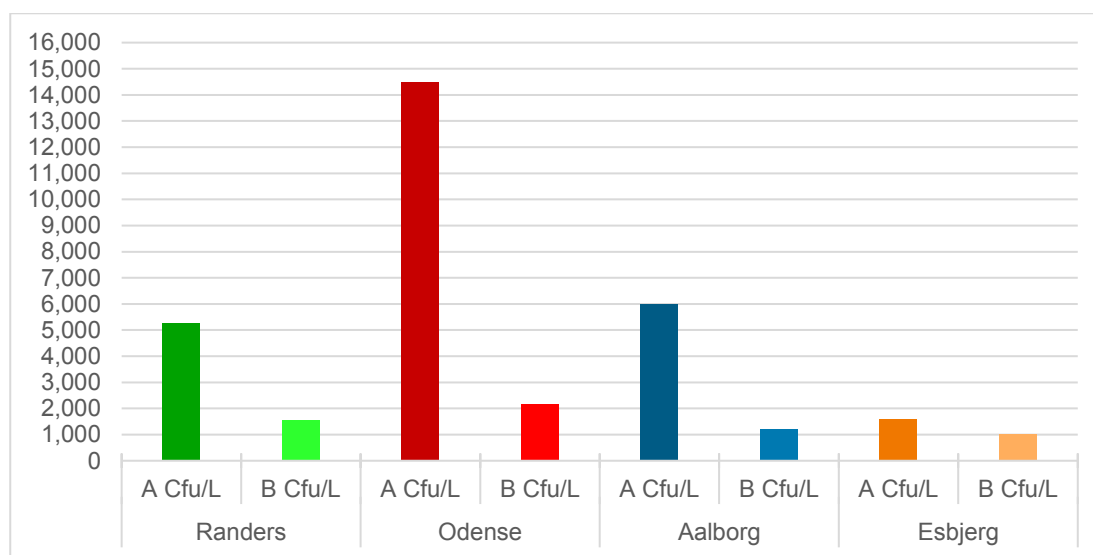
Tabel 2. Dyrkningsresultater for A og B prøver fra de fire byer opdelt efter niveauer.

By	≤ 1.000 A	≤ 1.000 B	> 1.000 til ≤ 10.000 A	> 1.000 til ≤ 10.000 B	> 10.000 A	> 10.000 B
Randers	7 (29%)	11 (46%)	8 (33%)	7 (29%)	9 (38%)	6 (25%)
Odense	7 (23%)	11 (37%)	7 (23%)	9 (30%)	16 (53%)	10 (33%)
Aalborg	8 (32%)	11 (44%)	7 (28%)	10 (40%)	10 (40%)	4 (16%)
Esbjerg	11 (44%)	13 (52%)	7 (28%)	8 (32%)	7 (28%)	4 (16%)

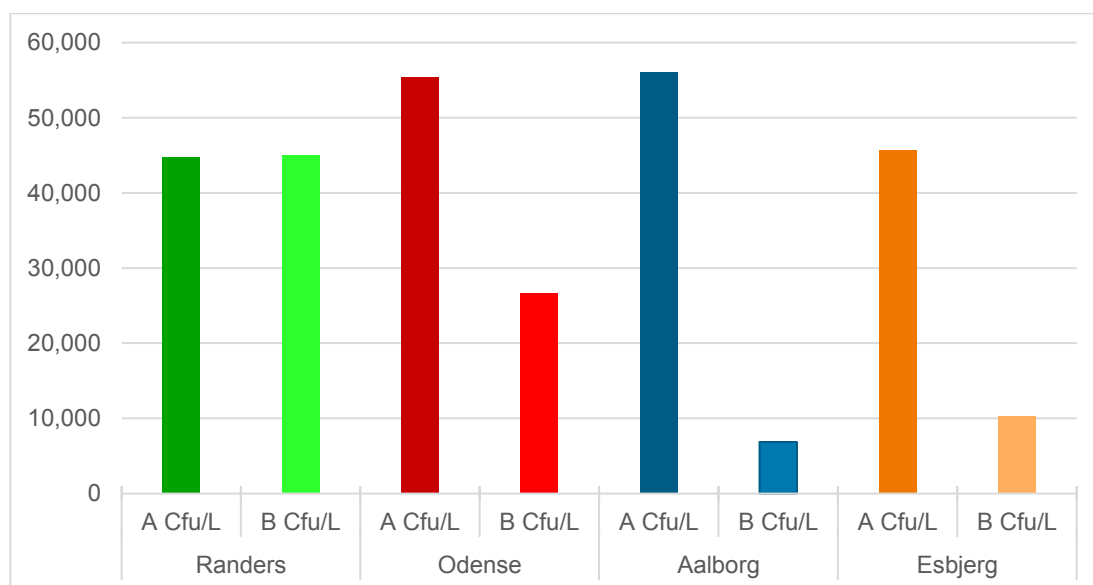


Resultater opdelt efter niveauer, som antal og andel af A og B prøver fra de fire byer med henholdsvis ≤ 1.000 cfu/L, > 1.000 til ≤ 10.000 cfu/L og > 10.000 cfu/L, kan belyse interessante forhold. I tabel 2 kan det således ses at Odense havde relativt flest anlæg med høje niveauer > 10.000 cfu/L, mens Esbjerg havde færrest, og også flest med lavt niveau ≤ 1.000 cfu/L. Overordnet så opfylder under halvdelen af anlæggene (på nær for Esbjerg) de generelle anbefalinger om ≤ 1.000 cfu/L i B prøver.

Trods de observerede forskelle mellem byerne, er der i forbindelse med lineær regressionsanalyse ikke påvist signifikant forskel på niveauerne hverken for A eller B prøver mellem de fire byer.



Figur 8. Medianværdier for dyrkning (cfu/L) for A og B prøver fra de fire byer.

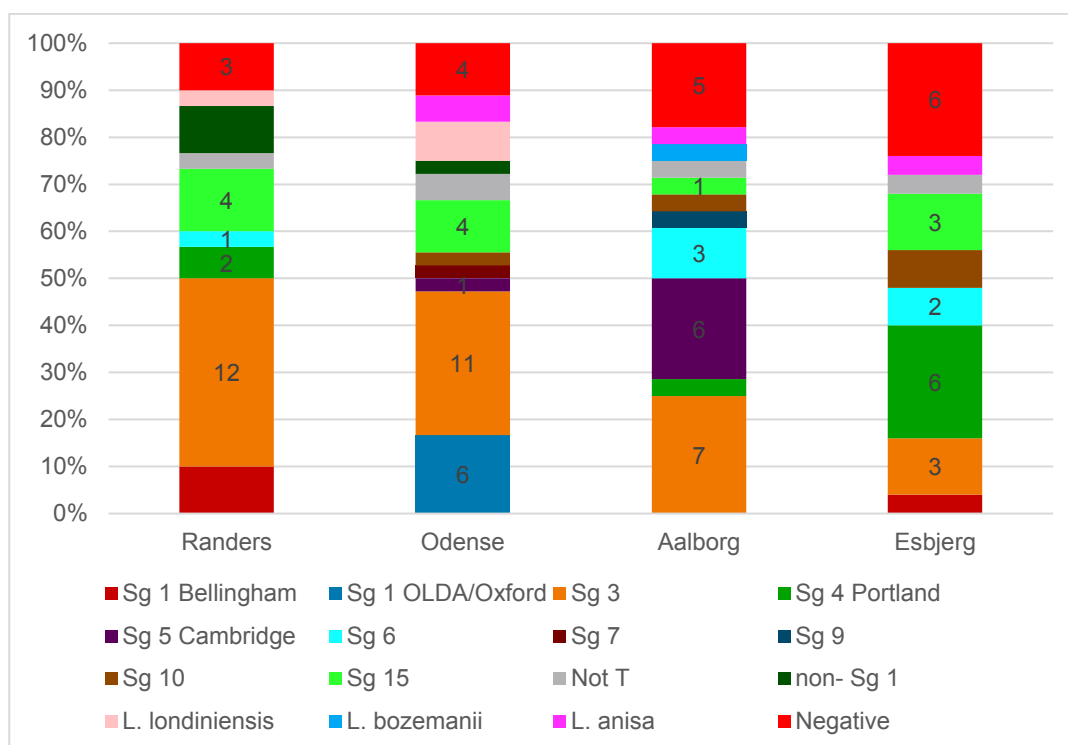


Figur 9. Middelværdier for dyrkning (cfu/L) for A og B prøver fra de fire byer.



Resultater af serogruppebestemmelse af isolater fra de fire byer

Der er i alt bestemt serogruppe for 98 *L. pneumophila* isolater fra de fire byer (26 fra Randers; 27 fra Aalborg; 20 fra Esbjerg og 25 fra Odense). Desuden er fire kolonier af *Legionella non-pneumophila* bestemt til art (v. MALDI-TOF). I alt blev der påvist 10 forskellige sero-/subgrupper, fem kolonier kunne ikke bestemmes til serogruppe og angives som "Ikke T". Der blev ud over *L. pneumophila* påvist tre andre *Legionella* arter (figur 10). Fordelingen er vist som relativ fordeling i figur 10. Fordelingen er gjort op således, at hvis der er påvist to kolonier tilhørende samme serogruppe i det samme anlæg, tæller den kun med én gang og er der påvist to forskellige serogrupper i samme anlæg tælles begge med. Det ses, at serogruppe-fordelingen er ret forskellig i de fire byer. Serogruppe 3 er den hyppigst påviste serogruppe og findes i alle fire byer, herudover er serogruppe 15 også påvist i alle fire byer. Det skal bemærkes at serogruppe 1 kun findes i tre byer, Randers, Esbjerg og Odense. I Odense er det serogruppe 1 subgruppe OLDA/Oxford ST1 (se figur 11 for ST). I de to andre byer hvor der er påvist serogruppe 1, var det for begge subgruppe Bellingham hhv. ST59 og ST26 (se figur 11 for ST). Både subgruppe OLDA/Oxford og Bellingham tilhører non-Pontiac gruppen. De to byer med højeste incidens af legionærsygdom havde de højeste andele af anlæg med serogruppe 1 og serogruppe 3. For tre anlæg i Randers og et anlæg i Odense blev der ikke foretaget serogruppebestemmelse af isolater tilhørende serogruppe 2-14, og er angivet som Non-Sg 1. Antal anlæg uden vækst er angivet som Negative.



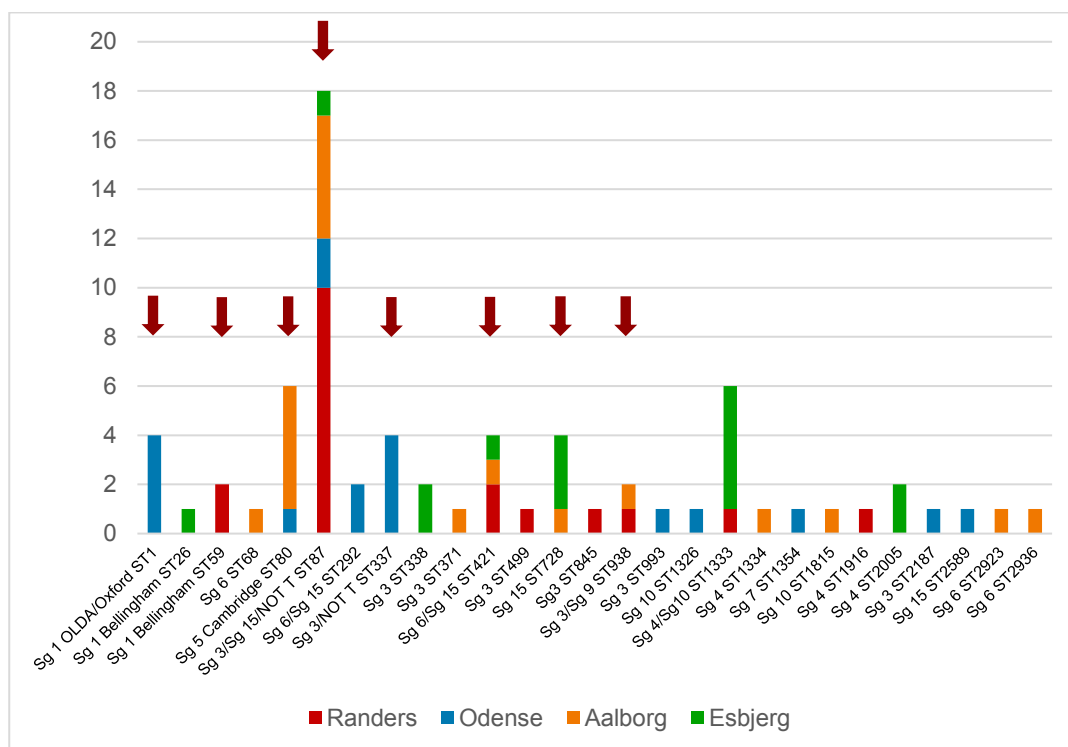
Figur 10. Den relative fordeling af *L. pneumophila* serogrupper, subgrupper og andre *Legionella* arter for de fire byer. Antal anlæg uden vækst er angivet med rødt. Antal anlæg uden serogruppebestemmelse er angivet som non-Sg 1. Antal anlæg med de hyppigste sero-/subgrupper er angivet med tal.



Resultater af sekvenstypebestemmelse af isolater fra de fire byer

Der blev udført WGS/ST for 76 *L. pneumophila* isolater fra de fire byer (svarende til bestemmelse af ST fra 20 anlæg i Randers; 18 fra Odense; 22 fra Aalborg og 16 fra Esbjerg). Der blev i alt påvist 27 forskellige sekvenstyper (figur 11). I figuren er de serogrupper der hører til en given ST angivet. I nogle tilfælde kan forskellige serogrupper godt have samme ST og ligeledes kan samme serogruppe være opdelt på flere sekvenstyper (serogruppen er ikke en fylogenetisk markør). Sekvenstyper, der i nummer ligger tæt f.eks. ST1333 og ST1334, er ikke et udtryk for, at de er tæt beslægtede (de er faktisk fjernt beslægtede selvom de begge er serogruppe 4 Portland). Sekvenstyperne får blot nummer, efterhånden som de opdages. Det vil sige, at nummeret siger lidt om hvor sjældne de er på verdensplan, jo højere nummer des færre isolater findes der som tommelfingerregel. Serogruppe 6 ST2936 fra Aalborg er f.eks. for første gang påvist i dette projekt, og er sandsynligvis fortsat det eneste globale isolat, der findes med denne ST. Enogtyve af de 27 sekvenstyper (78%) er kun påvist i én by. Den eneste sekvenstype der findes i alle fire byer er ST87, som dog er mest udbredt i Randers efterfulgt af Aalborg. ST87 er den sekvenstype, der næst hyppigst påvises for tilfælde af legionærsygdom i Danmark (se afsnittet **Hvad bliver man smittet med i Danmark?**). ST1 (serogruppe 1 OLDA/Oxford), som er den hyppigste årsag til samfundserhvervet legionærsygdom, er kun påvist i Odense. Som nævnt blev der påvist serogruppe 1 i to andre byer, begge subgruppe Bellingham, men ST59 i Randers og ST26 i Esbjerg. ST59 er en forholdsvis hyppig årsag til legionærsygdom (se tabel 3). Alene i 2020 er der påvist fem tilfælde (fra Jylland), mens ST26 ikke tidligere er påvist i Danmark.

I tabel 3 (data fra SSI) er antallet af patienter (hvis der er mere end 5) fra 2017 til 2020 opgjort for de sekvenstyper, der er påvist i de fire byer. For de øvrige ST er der ganske få (<5) eller ingen registrerede patienter i de fire år. Et højt antal patienter for en ST er ikke nødvendigvis et tegn på høj smitsomhed. Det kan også være fordi typen er meget almindelig – dette gælder eventuelt for ST87. Sekvenstyperne opgjort i tabel 3 er markeret med pile i figur 11.



Figur 11. Fordeling af *L. pneumophila* sekvenstyper på antal anlæg for de fire byer. Pile er angivet for de typer der har været årsag til mindst 5 tilfælde i Danmark fra 2017 til 2020 (tabel 3).

Tabel 3. Opgørelse af antal patienter (hvis der er > 5) der er smittet i Danmark fra 2017 til 2020 med de sekvenstyper der er påvist i de 4 byer. Tabellen er ordnet efter stigende ST.

Sero-/subgruppe	Sekvenstype (ST)	Antal patienter 2017-2020
Serogruppe 1 OLDA/Oxford	ST1	71
Serogruppe 1 Bellingham	ST59	11
Serogruppe 5 Cambridge	ST80	9
Serogruppe 3 (og andre)	ST87	39
Serogruppe 3 og Ikke T	ST337	11
Serogruppe 6 og 15	ST421	6
Serogruppe 15 og 6	ST728	13
Serogruppe 3	ST938	12



Karakteristik af ejendomme og varmtvandssystemer

I tabel 4 er karakteristika for ejendommene og varmtvandssystemer opgjort, temperaturforholdene er omtalt i afsnittet **Sammenhæng mellem temperatur og cfu/L**. For ejendommene i Aalborg og Esbjerg vides det, at der er gennemført mange renoveringer, som eventuelt også har omfattet varmtvandssystemerne, men da det ikke er oplysninger der systematisk er indsamlet er der ikke taget højde for dette i det efterfølgende.

Tabel 4. Karakteristik af ejendomme og varmtvandssystemer for de fire byer.

By	Antal systemer undersøgt (Antal vandprøver)	Temperatur-gennemsnit (Spændvidde) °C	Bygnings alder (Spændvidde) År	Størrelse gennemsnit (Spændvidde) Antal lejligheder	Systemer med varmtvands-beholder (%)
Randers	24 (48)	50,8 (44,5 – 55,6)	57,2 (8 - 82)	49,1 (16 - 181)	0 (0)
Odense	30 (60)	48,2 (35,4 – 58,4)	46,2 (0 - 71)	51,9 (12 - 140)	27 (90)
Aalborg	25 (50)	48,1 (37,9 – 60,1)	51,6 (1 - 135)	41,2 (12 - 126)	3 (12)
Esbjerg	25 (50)	48,5 (37,0 – 54,4)	48,7 (0 - 90)	33,2 (7 - 96)	3 (12)

Den gennemsnitlige ejendomsstørrelse for Randers og Odense ligger ret tæt med hhv. 49 og 52 lejligheder pr. ejendom. Ejendommene i Esbjerg var i gennemsnit noget mindre end i de andre byer med 33 lejligheder pr. ejendom. Gennemsnitsalderen for ejendommene var højest i Randers med 57 år, og lavest i Odense med 46 år.

A Sammenhæng mellem ejendomsstørrelse og cfu/L

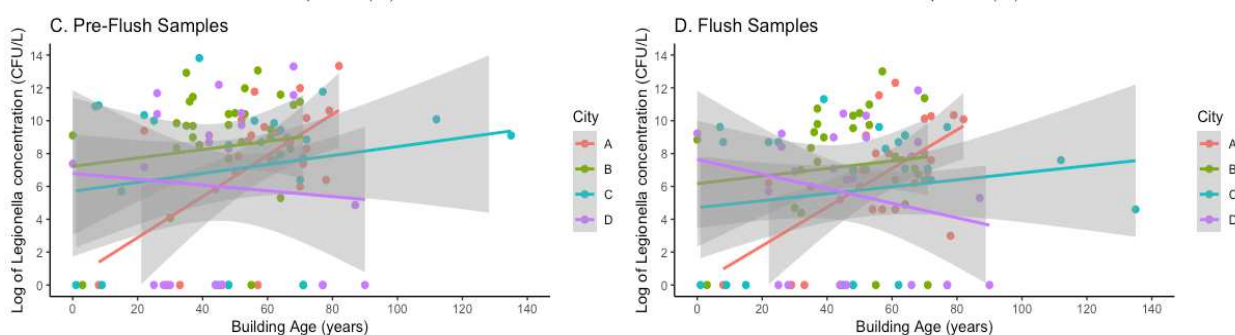
For at undersøge om der er sammenhæng mellem ejendomsstørrelse og antal påvist *Legionella* i B prøver ved dyrkning, er cfu/L opgjort for ejendomme med ≤ 40 lejligheder ($n = 67$) og med > 40 lejligheder ($n = 37$). Bygninger med ≤ 40 lejligheder havde en lavere median *Legionella*-koncentration (1.100 vs. 2.500; $p = 0,1$) og en lavere koloniseringsrate på 75% vs. 87% end B prøver fra bygninger med > 40 lejligheder. Bygninger med ≤ 40 lejligheder havde også en større andel (49% vs. 38%) af systemer med ≤ 1.000 CFU/L sammenlignet med B prøver fra bygninger med > 40 lejligheder.

Ovenstående tyder på at der er en vis sammenhæng mellem ejendommens størrelse og niveauet af dyrkbare *Legionella*, men forskellene var ikke signifikante.



B Sammenhæng mellem ejendomsalder og cfu/L

Bygningsalderen var ikke konsekvent associeret med stigende *Legionella*-koncentration (log (CFU/L)). Kun for Randers var der ved univariate regressionsanalyse en signifikant sammenhæng mellem stigende bygningsalder og en stigende *Legionella*-koncentration for både A- ($p < 0,001$) og B prøver ($p = 0,001$) (figur 12). Bygningerne i Randers havde den højeste median alder (60 år) og gennemsnitsalderen (57 år) af de fire byer. For Odense og Aalborg var der kun en svag association, for Esbjerg en svag omvendt association.



Figur 12. Sammenhæng mellem ejendomsalder og *Legionella*-koncentration (log cfu/L). Pre-flush = A prøver, Flush = B prøver, City A, B, C, D = Randers, Odense, Aalborg og Esbjerg.

C Varmtvandssystemerne

Alle ejendomme var forsynet med fjernvarme. Ejendommene er opgjort efter om der var en varmeveksler-løsning uden beholder (VVB) eller med VVB (tabel 4). Randers, Aalborg og Esbjerg havde således udelukkende eller i helt overvejende grad varmtvandssystem uden VVB, mens Odense i helt overvejende grad havde fjernvarme med VVB løsning (90%), i nogle tilfælde med to beholdere i serie (antal ikke opgjort). For de tre anlæg med VVB løsning i Esbjerg, havde et anlæg lavt niveau med 1.300 hhv. 300 cfu/L i A og B prøver, og to havde ingen påviste dyrkbare *Legionella*. For de tre anlæg med VVB i Aalborg, havde det to høje niveauer (82.000 og 15.000 cfu/L i B prøve), og det tredje var uden påvist *L. pneumophila*, men der var dog *L. anisa* (300 cfu/L) i A prøven. Den ene lejligheden i Aalborg med højt niveau (15.000 cfu/L) var ubeboet, og derfor har haft lavt vandforbrug i ukendt periode. Anlæg med VVB løsning i Odense havde generelt et højt niveau af *Legionella* (tabel 1, 2 og figur 8). Af tre anlæg uden VVB løsning i Odense havde ét ingen påviste *Legionella* ved dyrkning, ét havde hhv. 4.200 og 80 cfu/L af *L. anisa* i A og B prøverne, og det tredje havde et niveau på hhv. 19.000 og 1.100 cfu/L af *L. pneumophila* i A og B prøver.

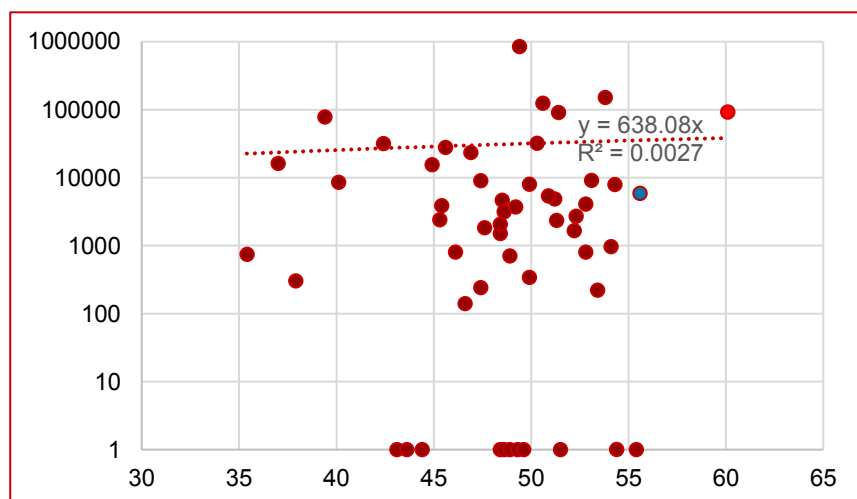
Sammenhæng mellem temperatur og *L. pneumophila* qPCR (GU/L) for B prøver

Vandprøver fra 53 ejendomme fra de fire byer blev undersøgt ved *Legionella* qPCR. I denne opgørelse sammenholdes qPCR for *L. pneumophila* (GU/L) for B prøver med de målte temperaturer (efter 1. minut) (figur 13). Elleve B prøver var negativ (20,8%), hvilket i praksis betyder < 500 GU/L. Dette er samme negative niveau som påvist ved dyrkning for B prøver (se afsnittet **Dyrkningsresultater for de fire byer**). Niveauerne er nogenlunde som for dyrkning (figur 7), men værdierne er generelt noget højere med



en medianværdien for qPCR på 2.380 GU/L, mens den for dyrkning var 1.200 cfu/L (se også afsnittet **Korrelation mellem dyrkning (cfu/L) og qPCR (GU/L) for *L. pneumophila***).

Den negative sammenhæng (fald i cfu/L med stigende temperatur) der blev set for temperaturer og cfu/L (figur 7), ses ikke for qPCR resultaterne (lineær trendlinje indsat). Forklaringen på dette er sandsynligvis, at qPCR også påviser ikke dyrkbare og døde bakterier. Ved temperaturer > 50 °C begynder *L. pneumophila* alt andet lige at dø. Ved temperaturer > 55 °C går det normalt ret hurtigt, så bakterierne kan være (delvis) døde/ikke dyrkbare i prøver der udtages ved høje temperaturer. Resultaterne tyder på, at selvom et system drives ved temperaturer > 50 °C, kan det alligevel være koloniseret (evt. i døde rørender), og qPCR resultaterne kan være høje trods negative eller lave værdier ved dyrkning. Den høje temperatur betyder dog, at det primært er døde bakterier (som ikke er smitsomme) der frigives ved tapstedet. Høje qPCR værdier, trods negative/lave dyrkningsresultater, bør eventuelt medføre en gennemgang af systemet, for at identificere områder hvor der kan være vækst. I afsnittet **Sammenhæng mellem temperatur og cfu/L** blev anlægget hvor der blev målt en temperatur på 60,1°C omtalt (figur 7 og figur 13). B prøven fra dette anlæg viste ingen vækst, men ved qPCR blev der påvist 91.600 GU/L (figur 13, orange punkt). A prøven fra anlægget viste moderat niveau af dyrkbare *Legionella* med 2.000 cfu/L men ved qPCR blev der målt 152.200 GU/L. Dette anlæg er derfor ikke fri for *L. pneumophila* og qPCR resultatet tyder på en ret kraftig kolonisering. Årsagen til det høje niveau målt med qPCR både for A og B prøver, kan dog også være at temperaturen først for nylig er hævet og at det høje niveau ved qPCR kan skyldes tilstedeværelse af en primær død biofilm. Efter en varme- eller biocid behandling kan der frigives høje niveauer af død biofilm i en lang periode, hvis anlægget ikke skylles godt igennem. En anden prøve, fra et anlæg med en målt temperatur på 55,6°C, viser den samme tendens (blåt punkt), her var qPCR resultatet godt en faktor 10 højere end dyrkningsresultatet hhv. 400 cfu/L og 5.860 GU/L. Overordnet viser resultaterne at temperaturen målt ved tapstedet, er en dårlig indikator for tilstedeværelse af *L. pneumophila* i varmtvandssystemet (døde eller levende).



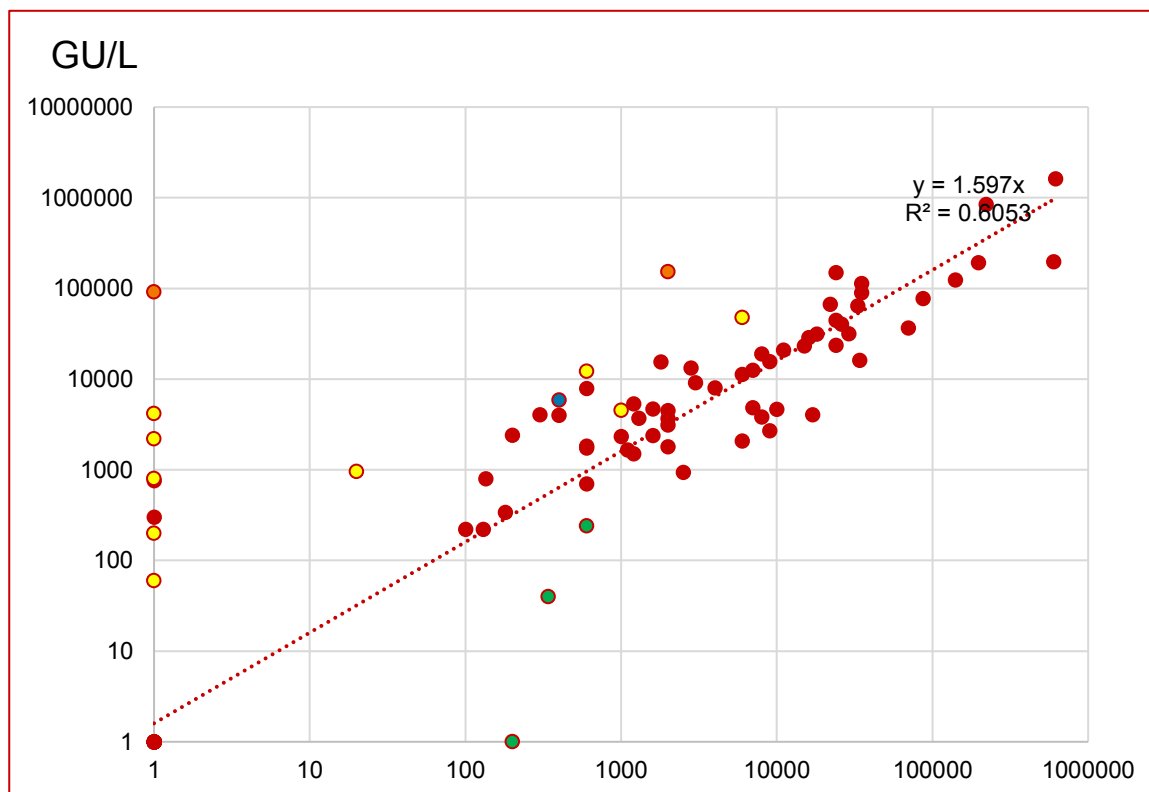
Figur 13. Sammenhæng mellem målte temperaturer (°C) efter 1 min. og *L. pneumophila* GU/L for B prøver (logaritmisk skala) fra 53 anlæg i Randers, Odense, Aalborg og Esbjerg. Ikke påvist er angivet som 1. Blåt og orange punkt er forklaret i teksten.



Korrelation mellem dyrkning (cfu/L) og qPCR (GU/L) for *L. pneumophila*

I figur 14 vises korrelationen (qPCR som funktion af dyrkning) mellem resultater opnået for dyrkning (cfu/L) og qPCR (GU/L) for *L. pneumophila*. Opgørelse er både for A og B prøver. Der blev udført qPCR for 106 prøver fra 53 anlæg. Resultater fra ét anlæg udgår, da qPCR reaktionen viste hæmning (hvilket er en lille andel af så mange prøver). Desuden udgår resultater fra en serie af prøver fra otte anlæg (16 prøver) fra Odense i denne korrelations undersøgelse. Selve qPCR'en opfyldte alle kvalitetskrav, men prøverne udviste systematisk afvigelser fra det "forventede", idet qPCR resultaterne lå alt for lavt relativt til dyrkningsresultaterne. Fejlen kan skyldes en systematisk fejl ved DNA oprensingsproceduren for denne serie. Det drejer sig om 16 konsekutive prøver, der er derfor ikke selekteret blandt prøverne. Herudover er alle prøver inkluderet, så der indgår i alt 88 prøver for qPCR og *Legionella* dyrkning. For to anlæg var der kun vækst af *L. anisa*, så disse tællers som negative for *L. pneumophila* ved dyrkning. I få prøver kan der være en blanding af *L. pneumophila* og en anden art, i alle tilfælde tælles det totale antal *Legionella* kolonier på vækstmediene, da de generelt ikke visuelt kan skelnes og opgøres hver for sig. Resultater for dyrkning opgives således som totalt antal *Legionella* kolonier, hvor ikke alle nødvendigvis er *L. pneumophila* (det drejer sig om ganske få prøver).

I figuren 14 er resultater opgivet på en dobbelt-logaritmisk skala. Værdier for ikke påvist er opgivet som 1 for begge analyser. Punkter kan overlappe, f.eks. er der 13 målinger i punktet (1,1). Når grafen aflæses skal man være opmærksom på at det er en dobbelt-logaritmisk skala, afvigelser fra regressionslinjen er på den måde tydeligst for lave værdier, desuden er den relative usikkerhed for begge analyser størst for lave værdier. I grafen er en lineær regressionslinje, ligningen og korrelationskoefficienten R^2 indsat. Korrelationskoefficienten er 0,61 og kan tolkes som moderat lineær sammenhæng, for at der skal være en stærk lineær sammenhæng, skal koefficienten være 0,9 eller derover. Ligningen ($y=1,597x$) viser at qPCR resultaterne i gennemsnit er 1,6 gange højere end dyrkningsresultaterne. Hvis man kun bruger resultater for A prøver er ligningen $y=1,4818x$ og $R^2=0,6054$ (ikke vist), og for B prøver er $y=2,7249x$ og $R^2=0,7554$ (ikke vist). Korrelationen mellem de to dataset (dyrkning/qPCR) er $=0,7735$ (simpel korrelationsanalyse i Excel).



Figur 14. Korrelation mellem dyrkning (cfu/L – X akse) og qPCR (GU/L – Y akse) for A og B prøver fra 44 anlæg. Orange, gule, grønne og blå punkter er forklaret i teksten. Ikke påvist både for dyrkning og qPCR er angivet som 1.

qPCR har således nogenlunde samme korrelationskoefficient for de to prøve kategorier, men for B prøver ligger qPCR resultaterne dog en del over dyrkningsresultaterne (2,7 gange i gennemsnit). Det passer imidlertid godt med resultater vist i afsnittet

Sammenhæng mellem temperatur og GU/L for *L. pneumophila* i B prøver, som tyder på at en del *Legionella* kan være døde/ikke dyrkbare i B prøver, specielt når temperaturene er høje. Dette er også en faktor der kan bidrage til at det målte *Legionella* kimtal (levende og dyrkbare) generelt er højere i A prøver end i B prøver, men ved qPCR for *L. pneumophila* har A prøver dog i lighed med resultater for dyrkning også en højere medianværdi (4.520 GU/L) end for B prøver (2.810 GU/L).

En del punkter i figur 13 ligger på Y akse (positiv qPCR/negativ dyrkning). Det skal dog bemærkes at det for fem dyrknings negative prøver drejer sig om lave qPCR værdier < 1.000 GU/L. En del af de afvigende resultater, hvor der er påvist højere resultater for qPCR end for dyrkning, kan forklares ved at der har været kraftig baggrunds-/overvækstvækst af prøven (gule punkter). Andre bakterier vokser ofte hurtigere end *Legionella* og kan overvokse substratet og dække eller hæmme væksten af *Legionella*. Problemet kan til dels overkommes ved at syre og varmebehandle prøven (*Legionella* klarer bedre end de fleste andre bakterier høje temperature og lav pH), men behandlingen kan også være hård ved *Legionella*, og nogle vil dø, hvorfor *Legionella* kimtallet kan undervurderes. En enkelt qPCR værdi er meget høj (91.600 GU/L), mens dyrkning er negativ (orange punkt på Y akse). Det er B prøven fra anlægget med en temperatur på 60,1°C, som også er omtalt i tidligere afsnit



Sammenhæng mellem temperatur og cfu/L og Sammenhæng mellem temperatur og GU/L for *L. pneumophila* i B prøver. Det andet punkt, der er markeret med orange, er qPCR resultatet for A prøven fra det samme anlæg. Antageligt har langt de fleste *L. pneumophila* været døde ved prøvetagningen. Et anden måling (markeret med blå) viser lidt det samme som ovenstående. Det er det andet anlæg (hvor der både er udført dyrkning og qPCR) med en målt temperatur over 55°C (55,6°C), her var der for B prøven godt en faktor 10 forskel på qPCR resultatet og dyrkningsresultatet. Et par punkter viser vækst af *Legionella* men negativt eller lavt niveau for qPCR (grønne punkter), det er dog niveauer der ligger tæt på metodens (qPCR) detektionsgrænse og under metodens grænse for kvantificering (limit of quantification).

Frem for at se på værdierne en til en, for to metoder som i princippet ikke måler nøjagtigt det samme, kan det være interessant at se på hvor god qPCR er til at forudsige hvilket niveau en dyrkning for *L. pneumophila* vil give (tabel 5). Resultaterne i tabellen skal læses på denne måde - f.eks. for niveauet "1.000 GU/L": Hvis man får et resultat ved *L. pneumophila* qPCR der er ≤ 1.000 GU/L, så er sandsynligheden ca. 0,96 for at dyrkning for *Legionella* vil give et resultat ≤ 1.000 cfu/L. Derimod vil værdier > 1.000 GU/L i ca. 25% af tilfældene overestimerer niveauet af dyrkbare *L. pneumophila*, som vil give et resultat < 1.000 cfu/L ved dyrkning. Får man et qPCR resultat mellem >1.000 og ≤ 10.000 GU/L så er der en sandsynlighed på ca. 0,62 for at dyrkningsresultatet vil være på samme niveau, og der en sandsynlighed på ca. er 0,98 for at dyrkningsresultatet vil være ≤ 10.000 cfu/L.

Tabel 5. Andelen af prøver (A og B) hvor der er overensstemmelse mellem qPCR og dyrkning på de niveauer der er angivet i tabellen.

Niveau for qPCR	≤ 500 GU/L	≤ 1.000 GU/L	≤ 10.000 GU/L	≤ 100.000 GU/L
Overensstemmelse med dyrkning (cfu/L) for A og B prøver	21/22 (95,5%)	27/28 (96,4%)	56/57 (98,2%)	80/80 (100%)
Niveau for qPCR	> 500 GU/L	> 1.000 GU/L	> 10.000 GU/L	> 100.000 GU/L
Overensstemmelse med dyrkning (cfu/L) for A og B prøver	55/66 (83,3%)	46/60 (76,7%)	21/31 (67,7%)	5/8 (62,5%)
Niveau for qPCR	0 til ≤ 1.000 GU/L	> 1.000 til ≤ 10.000 GU/L	> 10.000 til ≤ 100.000 GU/L	> 100.000 GU/L
Overensstemmelse med dyrkning (cfu/L) for A og B prøver	27/28 (96,4%)	18/29 (62,1%)	14/23 (60,9%)	5/8 (62,5%)

Hvis man vælger at lægge en reaktionsgrænse for niveauet for B prøver (varmt vand) på 1.000 cfu/L, hvilket er et niveau der generelt anbefales internationalt (WHO, 2017; Lee, 2017), hvor god er qPCR så til at forudse at denne grænse er overholdt, hvis grænseværdien for qPCR også sættes til 1.000 GU/L? Af 22 anlæg med ≤ 1.000 cfu/L for B prøver, var der ingen tilfælde hvor qPCR underestimerer niveauet for dyrkning. Det skal forstået på den måde, at der ikke er prøver hvor dyrkningsresultatet ligger $>$



1.000 cfu/L, hvis qPCR \leq 1.000 GU/L. Derimod overestimerede qPCR dyrkningsresultatet i 7 af de 22 prøver (32%). Som vist for korrelationsligningen for B prøver $y=2,7249x$, så ligger qPCR resultaterne i gennemsnit en faktor 2,7 over niveauet for dyrkningsresultaterne for B prøver. Hvis denne faktor anvendes konservativt for de 44 inkluderede anlæg, og man bruger en faktor 2; dvs. sætter reaktionsgrænsen for qPCR til \leq 2.000 GU/L (og stadig skal overholde 1.000 cfu/L for dyrkning), så vil qPCR i to tilfælde af 19 "underestimere" niveauet for dyrkning (10,5%), men det er to prøver hvor grænseværdien på 1.000 cfu/L kun akkurat er overskredet med hhv. 1.100 og 1.200 cfu/L (afvigelsen i forhold til 1.000 cfu/L ligger langt under metodens (dyrkning) usikkerhed på dette niveau). I afsnittet **Generel diskussion/Kvantitativ PCR (qPCR)** laves en beregning for en reaktionsgrænse på 3.000 GU/L som foreslået af Lee et al. 2011.

Resultater for qPCR for *L. pneumophila* serogruppe 1 omtales i diskussionsafsnittet for de fire byer.

Resultater for Legionella spp. qPCR

Alle prøver der blev undersøgt ved qPCR blev også undersøgt for totalt antal *Legionella* (alle arter; der anvendes en specifik *Legionella* spp. PCR baseret på amplifikation af en region af *Legionella* 16S DNA). På nær to af de ekskluderede prøver fra Odense (se ovenstående afsnit **Korrelation mellem dyrkning (cfu/L) og qPCR (GU/L) for L. pneumophila**), var alle prøver fra de 53 undersøgte anlæg positive for *Legionella* spp. Niveauet var meget højt for de fleste prøver fra alle fire byer, medianen for A prøver var 33.250 og for B prøver 39.940 GU/L (spændvidde fra 280 til 1.546.200). Medianværdierne for A og B prøver ligger meget tæt på hinanden og viser at bakterierne kun i ringe grad bliver skyllet ud efter et minut, og må være udbredt i hele systemet (eventuelt også i det kolde fødevand). Generelt var det således at *L. pneumophila* qPCR resultaterne var højeste i A prøver og var faldende til B prøven (se afsnitte **Korrelation mellem dyrkning (cfu/L) og qPCR (GU/L) for L. pneumophila**), hvorimod *Legionella* spp. qPCR stort set forblev på samme niveau i begge prøvertyper.

Da der samtidigt påvises *L. pneumophila* ved qPCR, kan man ved omtrent lige høje værdier for de to PCRer, vurdere om anlægget kun eller i overvejende grad er koloniseret med *L. pneumophila*. Det var tilfældet for i alt ni anlæg, og karakteristisk for disse anlæg (på nær ét) var høje værdier for både *L. pneumophila* qPCR og dyrkning.

For de højeste værdier der blev påvist i de otte anlæg (det ene fra regnet), i enten A eller B prøver, var gennemsnittet:

- Dyrkning - \bar{x} = 226.525 cfu/L (spredning fra 33.000 til 617.000 cfu/L)
- qPCR *L. pneumophila* - \bar{x} = 397.073 GU/L (spredning fra 64.220 til 1.619.200 GU/L)
- qPCR *Legionella* spp. - \bar{x} = 322.728 GU/L (spredning fra 54.480 til 1.085.800 GU/L)

For alle andre anlæg var værdierne for *Legionella* spp. qPCR højere end for *L. pneumophila* qPCR. De høje niveauer i disse anlæg (som er langt højere end de generelle niveauer), kan betyde at anlæg der er koloniseret med *Legionella* non-



pneumophila arter, til dels kan beskyttet mod høj kolonisering af *L. pneumophila* eller vice versa (hypotese dannet alene på baggrund af disse resultater).

For to anlæg blev der ved dyrkning kun påvist *L. anisa*. Disse anlæg var også kun positive for *Legionella* spp. ved qPCR, men ikke på et niveau der adskiller dem for alle andre prøver hvor der ikke blev påvist *L. pneumophila* ved qPCR. Så resultater for *Legionella* spp. kan ikke bruges til at forudse væksten af *Legionella non-pneumophila*. I den sammenhæng er det vigtigt at huske på, at de fleste andre arter (måske med undtagelse af *L. anisa* og få andre arter) gror dårligt eller slet ikke på de anvendte vækstsubstraterne. Det vurderes at *Legionella* spp. qPCR ikke kan anvendes (som enkeltstående test) som et led i en risikovurdering, da selv høje værdier ikke er en prædikator for vækst af patogene *Legionella*, hverken for *L. pneumophila* eller andre arter. Resultaterne viser at *Legionella* er en naturlig del af mikrofloraen i stort set alle vandsystemer, men at *Legionella non-pneumophila* generelt ikke udgør en sundhedsrisiko. Der kan dog være specielle tilfælde hvor smitte med andre arter mistænkes (se afsnittet **Legionella forekomst og levevis**), hvor qPCR for *Legionella* spp. kan være et brugbart led i smitteudredningen.

Diskussion af resultater for hver af de fire byer

I det følgende diskuteres resultaterne for hver by. I diskussionen inddrages SSIs overvågnings data for tilfælde af legionærsygdom herunder dyrkningsverificerede tilfælde (fraserteret tilfælde smittet ved rejse) fra hver byerne. Tilfældene og populationsstørrelserne er opgjort for de postnumre hvorfra der er taget vandprøver, populationsstørrelserne (opgjort for 2017) passer derfor ikke nødvendigvis med populationsstørrelserne der officielt angives for byerne. For hver by angives de beregnede incidenser (alle anmeldte tilfælde) og raten af dyrkningspåviste tilfælde. For de to byer med høj incidens (Randers og Odense) inddrages overvågnings data for 7 år (2014 til 2020), mens der for de to byer med lav incidens (Aalborg og Esbjerg) inddrages overvågningsdata for 11 år (2010 til 2020) for at øge antallet af kliniske isolater for disse byer (tabel 6). I diskussionen inddrages resultater fra projektet som ikke er præsenteret i afsnittet **Resultater**, herunder resultater af qPCR for *L. pneumophila* serogruppe 1. Middelværdierne for vandprøvedyrkning vægtes ikke højt, og benyttes generelt ikke når byerne skal sammenlignes, da enkelte outliers med meget højt niveau, giver meget høje gennemsnit, som det f.eks. tydeligt ses for middelværdien for B prøverne fra Randers (tabel 1 og figur 9).



Tabel 6. Karakteristik af registrerede (anmeldte) og dyrkningspåviste tilfælde af legionærsygdom fra de fire byer, 2010-2020.

By	Totalt antal tilfælde (Dyrkningspåviste)	Populations størrelse (2017) x1,000	Antal år inkluderet	Incidens rate* (Dyrkningspåviste)	% Mænd (Dyrkningspåviste)	Median alder År (Dyrkningspåviste)
Randers	45 (22)	64	7	10.0 (4.9)	46% (50%)	65 (61)
Odense	100 (52)	143	7	10.0 (5.2)	56% (56%)	74 (74)
Aalborg	25 (11)	116	11	2.0 (0.9)	60% (60%)	66 (65)
Esbjerg	20 (6)	80	11	2.3 (0.7)	60% (50%)	73 (75)

* Incidens rate (tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år)

Randers

Randers havde den højeste rate af koloniserede (dyrknings positive) anlæg på 87,5%, men medianværdierne for A og B prøver ligger tæt på det der blev fundet for Aalborg (tabel 1 og figur 8). Randers havde dog lidt højere niveau i B prøver end Aalborg (tabel 1 og 2). Vandprøver fra Randers ligger på et højere niveau end for Esbjerg og lavere end for Odense for alle parametre (tabel 1 og 2). Randers havde næsthøjeste gennemsnitlige ejendomsstørrelse (49 lejligheder; tabel 4) som kan være en risikofaktor for at varmtvandsanlægget er koloniseret med *Legionella*. Randers havde den ældste boligmasse (gennemsnit 57 år) af de fire byer (tabel 4), og for Randers blev der fundet en signifikant sammenhæng mellem ejendomsalder og *Legionella*-koncentration (se afsnittene **Sammenhæng mellem ejendomsstørrelse og cfu/ml** og **Sammenhæng mellem ejendomsalder og cfu/L**). For Randers er der ikke registreret ejendomsrenoveringer, men da det ikke er systematisk registreret, vides det ikke om det er medvirkende til denne association mellem alder og *Legionella*-koncentration for Randers (figur 12).

I vandprøver fra Randers blev der fundet et højt niveau af dyrkbare *L. pneumophila* serogruppe 3 (12 af 16 anlæg hvor der er foretaget serogruppebestemmelse; 75%) og relativt lavt niveau af *L. pneumophila* serogruppe 1 (3 af 24 anlæg; 12,5%) (figur 10). Den dominerende sekvenstype var ST87 (11 af 20 isolater med kendt sekvenstype (55%) og i 10 af i alt 24 anlæg (41,7%)). For serogruppe 1 blev der kun påvist ST59 (figur 11). Begge sekvenstyper har været associeret med legionærsygdom (tabel 3), hvor ST87 er den næst hyppigste årsag efter ST1 til legionærsygdom i Danmark.

For nærmere at beskrive hvilke typer der er de hyppigste årsager til legionærsygdom i Randers, er der trukket data fra SSIs overvågningsregister for alle dyrkningsverificeret tilfælde af legionærsygdom (fraregnet tilfælde med rejsetilknytning) med bopæl i Randers (postnumre svarende til hvorfra der er taget vandprøver) fra 2014 til 2020 (tabel 7). Tilfælde associeret med plejehjem (ét ST334 tilfælde) og nosokomielle tilfælde som har været indlagt på Regionssygehuset Randers (ét ST87 tilfælde) er inkluderet. I alt var der 22 tilfælde på 7 år, hvilket giver en incidens på 4,9 tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år af dyrkningspåvist legionærsygdom.



Af de hyppigste typer påvist hos patienter fra Randers (Philadelphia ST1, serogruppe 3 ST87 og Benidorm ST42), er det kun ST87 der er påvist i dette projekt (tabel 7). I Randers er den hyppigste årsager til legionærsygdom således serogruppe 1 tilhørende gruppe Pontiac (11 tilfælde af 22 (50%)). Derimod spiller OLDA/Oxford ST1 med ét tilfælde kun en meget lille rolle i Randers. Som omtalt i afsnittene **Typoning af *L. pneumophila* og *L. pneumophila* smitsomhed og Hvad bliver man smittet med i Danmark?** påvises stammer tilhørende Pontiac gruppen relativt sjældent fra miljøprøver. Som vist i tabel 7 er isolater tilhørende Pontiac gruppen dog påvist nogle gange i forbindelse med smitteudredninger i Randers, det gælder både for Philadelphia ST1 og Benidorm ST42 (for alle de opgjorte tilfælde er de påvist fra vandsystemer i patienters eget hjem). Men vi har ikke vidst i hvilken grad disse typer var udbredt i området. Da typerne ofte påvises ved smitteudredninger, kunne man formode at typerne var almindelige. Som vist i denne undersøgelse af de 24 anlæg fra Randers, tyder det ikke på at disse Pontiac typer er almindeligt udbredt i Randers. Ud over de angivne tilfælde udføres der også i Randers en del smitteudredninger for ikke-dyrkningsverificerede tilfælde (påvist med *L. pneumophila* urin test (LUT) eller/og med PCR). Her er de angivne Pontiac typer også påvist i nogle tilfælde.

Tabel 7. Antal dyrkningsverificerede tilfælde af legionærsygdom for patienter med bopæl i Randers, 2014 til 2020. Tilfældene er sorteret efter antal patienter med de angivne typer, subsidiært om de er påvist ved smitteudredning (kolonne til højre).

Tabel 7 - Patienter Randers 2014 til 2020 (indbyggertal 64.000)					
Serogruppe	Subgruppe	Pontiac	ST	Antal ptt.	Påvist i vandprøver
1	Philadelphia	Ja	1	6	4 x
3		NA	87*	5	4 x
1	Benidorm	Ja	42	4	2 x
1	Bellingham	Nej	59*	1	1 x
3		NA	93	1	1 x
1	Bellingham	Nej	334	1	1 x
1	Allentown/France	Ja	62	1	0
1	OLDA/Oxford	Nej	1	1	0
3		NA	2207	1	0
3		NA	2937	1	0

* Påvist i vandprøver fra Randers i dette projekt (Projekt 2 – Vandprøver) (figur 11).

Serogruppebestemmelsen og sekvenstypebestemmelse er i denne undersøgelse kun udført som stikprøver, men for alle prøver hvor tilstedeværelse af serogruppe 1 blev påvist med Oxoid Latex Test (se **Materialer og Metoder**), blev der udført subgruppebestemmelse med monoklonale antistoffer. For alle tre anlæg med påvist serogruppe 1 blev der påvist subgruppe Bellingham, to af disse isolater blev bestemt til ST59. I to af disse anlæg blev der også påvist serogruppe 3 ST87 og i et anlæg blev der ud over subgruppe Bellingham også påvist serogruppe 4 subgruppe Portland ST1333 og *L. londiniensis*.

Ved qPCR for serogruppe 1, blev der kun påvist serogruppe 1 i to anlæg (2/12 anlæg; 16%) som også var positive for serogruppe 1 ved dyrkning. For det ene anlæg med en



værdi på grænsen af metodes (qPCR) detektionsgrænse (500 GU/L) og med ca. 10x så mange total *L. pneumophila*. For det andet positive anlæg var niveauet af *L. pneumophila* målet ved qPCR også langt højere end niveauet for serogruppe 1 (ca. 100x). Kun B prøven viste et højt niveau af serogruppe 1 på 7.620 GU/L, men niveauet af *L. pneumophila* var på 849.600 GU/L. Af yderligere ni anlæg undersøgt ved qPCR, blev der ikke påvist serogruppe 1. For et anlæg blev der ved dyrkning påvist serogruppe 1 Bellingham (én koloni), men hvor qPCR var negative for serogruppe 1. Anlægget var kraftigt koloniseret med non-serogruppe 1 (serogruppe 3 ST87 blev påvist), da der både ved dyrkning og qPCR blev påvist mellem 26.000 og 40.000 cfu/L og GU/L i A og B prøverne, så serogruppe 1 koncentrationen var lavt (og "tilfældigt" påvist ved dyrkning) og antageligt under sensitiviteten på 500 GU/L for qPCR.

Serogruppe 1 forekommer således i relativt få af de undersøgte anlæg (ved dyrkning i tre af 24 (12,5%), og ved qPCR i to af 12 undersøgte (16,7%)), og ved påvist forekomst kun i generelt lave koncentrationer, hvor begge metoder (som ovenævnte viser) kan overse tilstedeværelsen. Ingen af anlæggene var således kun positive for serogruppe 1. Denne undersøgelse viser desuden at serogruppe 1 Pontiac sandsynligvis ikke er særligt udbredt i Randers, men ved forekomst, som er påvist ved smitteudredninger (se tabel 7), udgør de sandsynligvis en forhøjet risiko for smitte. Serogruppe 3 ST87 ser derimod ud til at have stor udbredelse i byen, og findes generelt i højt antal i de undersøgte anlæg. Bedømt på den udbredte forekomst, har typen en relativ lav smitsomhed, men forårsager alligevel en del samfundserhvervede tilfælde (tabel 7).

Som konklusion: *Den høje incidens af legionærsygdom i Randers kan sandsynligvis forklares ved to forhold; 1: Forekomst, men antagelig relativ sjælden, af smitsomme typer (Philadelphia ST1 og Benidorm ST42) og 2: En ret udbredt forekomst (ofte på højt niveau) af den mindre smitsomme type serogruppe 3 ST87. Bellingham ST59 (non-Pontiac) har tilsyneladende en vis udbredelse (i de påviste anlæg dog på lavt niveau), men spiller tilsyneladende ikke den store rolle med kun ét påvist tilfælde på syv år (tabel 7).*

Odense

Af de fire byer havde Odense den næst højeste rate af positive anlæg på 83,3% efter Randers. Desuden havde Odense de højeste medianværdier for A og B prøver (tabel 1 og figur 7) og den højeste andel af anlæg med højt indhold >10.000 cfu/L for A og B prøver på hhv. 53 og 33% (tabel 2). Ejendommene for Odense havde en gennemsnitlig alder på 46 år (laveste blandt de fire byer) og den højeste gennemsnitlige ejendomsstørrelse af de fire byer på 52 lejligheder. Men disse faktorer adskiller ikke Odense afgørende i forhold til Esbjerg med en gennemsnits alder på 49 år og Randers med en gennemsnitlig ejendomsstørrelse på 49 lejligheder. Det der afgørende adskiller anlæggene i Odense fra de andre byer, er at langt de fleste anlæg i Odense var forsynet med varmtvandsbeholdere (90%) og i nogle tilfælde i serie (se afsnittet **Karakterisering af ejendomme varmtvandssystemer**).

I vandprøver fra Odense blev der påvist *L. pneumophila* serogruppe 1 ved dyrkning fra seks anlæg af 30 anlæg (20%) og i alle tilfælde subgruppe 1 OLDA/Oxford. Fire isolater blev ved sekvenstypebestemmelse alle bestemt til ST1 (figur 10 og 11), som er den hyppigste årsag til legionærsygdom i Danmark (se afsnittet **Hvad bliver man smitte med i Danmark?** og tabel 3). I 11 ud af 22 anlæg med



serogruppebestemmelse blev der påvist *L. pneumophila* serogruppe 3 (50%). De var fordelt på fire forskellige sekvenstyper ST87, ST337, ST993 og ST2187. Heraf var ST337 den hyppigst påviste (fire anlæg) de tre andre kun i ét anlæg hver. De tre sekvenstyper ST337, ST993 og ST2187 er varianter af hinanden med indbyrdes forskelle i kun ét locus. ST87 (der normalt er knyttet til serogruppe 3) var i Odense i ét tilfælde knyttet til serogruppe 15. ST87 er ikke tæt relateret til de tre andre nævnte sekvenstyper. Serogruppe 5 subgruppe Cambridge ST80, som var hyppig i Aalborg, blev påvist i et anlæg i Odense.

For nærmere at beskrive hvilke typer der er de hyppigste årsager til legionærsygdom i Odense, er der trukket data fra SSIs overvågningsregister for alle dyrkningsverificeret tilfælde (fraregnet tilfælde associeret til rejse) af legionærsygdom med bopæl i Odense (postnumre hvorfra der er taget vandprøver) fra 2014 til 2020 (tabel 8). Tilfælde af plejecenterssmitte (ét OLDA/Oxford ST1 og ét ST80) og nosokomial infektion (ét OLDA/Oxford ST1, ét ST80, ét ST337, ét 728 og ét ST1323) er inkluderet. I alt var der 52 tilfælde på 7 år i Odense, hvilket giver en incidens af dyrkningsverificeret legionærsygdom på 5,2 tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år.

L. pneumophila serogruppe 1 subgruppe OLDA/Oxford ST1 var den hyppigste årsag til legionærsygdom i Odense med 13 af 52 (25%) (tabel 8), hvilket svarer til landsgennemsnittet (se afsnittet **Hvad bliver man smittet med i Danmark?**). Af tabel 8 fremgår det at Knoxville ST9 (tilhørende Pontiac) er den næst hyppigste årsag til smitte i Odense, men syv af de otte høre til et sandsynligt udbrud af legionærsygdom (det største påviste i Danmark). Udbruddet var langvarigt fra oktober 2015 til januar 2016, i alt var der ni dyrkningsverificerede tilfælde med Knoxville ST9 (to boede uden for Odense by, hvorfor de ikke er med i opgørelsen i tabel 8). Der var antageligt op til dobbelt så mange tilfælde i udbruddet, men de var ikke dyrkningspåviste. En del af patienternes vandforsyning blev undersøgt, men Knoxville ST9 blev ikke påvist. Kilden antages at være en ekstern kilde. Det kunne f.eks. være et køletårn. Typen er antageligt ikke eller sjældent knyttet til varmtvandsforsyninger (aldrig påvist i Danmark). I Odense har der efterfølgende kun påvist ét tilfælde med Knoxville ST9, som hændte ca. et år efter det sidste udbrudstilfælde.

L. pneumophila serogruppe 5 subgruppe Cambridge ST80 udgør en relativ stor andel af smittede i Odense (6/52; 11,5%), typen blev imidlertid kun påvist i ét anlæg. I Aalborg hvor typen blev påvist hyppigere (i seks anlæg), var der ingen kendt smittede uden for sundhedssektoren (hospital), mens fire af de seks tilfælde fra Odense var smittet uden for sundhedssektoren hvor der var ét plejecenter- og ét hospitalsassocieret tilfælde. Det kan dog bemærkes at tre af de fem smittede uden for sygehus bor inden for et relativt lille område i Odense med én til to km mellem adresserne. Typen kan eventuelt have en begrænset udbredelse i byen og derfor kun påvist i ét anlæg (i samme område som ovenstående) i denne undersøgelse.

Sammenlignet med Randers som havde omtrent samme incidens af dyrkningspåvist legionærsygdom som Odense, udgør serogruppe 1 Pontiac en meget mindre andel i Odense. Hvis de syv udbrudstilfældene (ST9) fraregnes (idet der antageligt er tale om én fælles ekstern smitekilde), er incidensen for Pontiac smitte hhv. ca. 2,5 (Randers) og ca. 0,5 (Odense) tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år.



Tabel 8. Antal dyrkningsverificerede tilfælde af legionærsygdom for patienter med bopæl i Odense, 2014 til 2020. Tilfældene er sorteret efter antal patienter med de angivne typer, subsidiært om de er påvist ved smitteudredning (kolonne til højre).

Tabel 8 - Patienter Odense 2010 til 2020 (indbyggertal 143.000)					
Serogruppe	Subgruppe	Pontiac	ST	Antal ptt.	Påvist i vandprøver
1	OLDA/Oxford	Nej	1*	13	3 x
1	Knoxville	Ja	9	8	0
5	Cambridge	NA	80*	6	1 x
3/13		NA	337*	3	0
6		NA	728	2	0
10/4	Portland	NA	1323	1	1 x
6		NA	1609	2	1 x
1	Knoxville	Ja	1256	2	0
3/Ikke T		NA	87*	3	0
1	Philadelphia	Ja	1	1	1 x
1	Allentown/France	Ja	62	1	0
1	Allentown/France	Ja	109	1	0
1	OLDA/Oxford	Nej	154	1	0
1	OLDA/Oxford	Nej	1071	1	0
3		NA	845	1	0
4	Portland	NA	1535	1	0
10		NA	1323	1	0
10		NA	1745	1	0
Ikke T		NA	1326	1	0
Ikke T		NA	2227	1	0
Ikke T		NA	Ukendt	1	0

Tilfældene fra Odense er knyttet til i alt 20 forskellige sekvenstyper (tabel 8) hvor der i Randers var ni (tabel 7), i Aalborg syv (tabel 8) og i Esbjerg fem forskellige sekvenstyper (tabel 11). Det høje antal påvist sekvenstyper i Odense hænger naturligvis sammen med det langt højere antal dyrkningspositive tilfælde fra Odense end fra de andre byer. Relativt er diversiteten i f.eks. Esbjerg højere (5 typer/6 patienter; 0,83) end i Odense (20 typer/52 patienter; 0,38). Imidlertid er det en stor diversitet af typer der har været årsag til legionærsygdom i Odense, og de fleste kan betragtes som lavvirulente typer knyttet til *L. pneumophila* non-serogruppe 1 (13 sekvenstyper).

Kun fire sygdomsrelaterede typer blev påvist i vandprøver fra byen (tabel 8, mærket med *), mens de resterende seks typer der blev påvist (figur 11), ikke har været associeret med sygdom fra 2014 til 2020 (tabel 8).

Af 25 anlæg med vækst af *L. pneumophila* (et anlæg havde kun vækst af *L. anisa*) blev der påvist serogruppe 1 i seks anlæg (24%) og af alle undersøgte anlæg i 20% (6/30). I to anlæg blev der alene påvist serogruppe 1 i ret høje niveauer fra 9.000 til 408.000 cfu/L i A prøver og fra 4.200 til 7.000 cfu/L i B prøver. I alle tilfælde blev de bestemt til



subgruppe OLDA/Oxford (figur 10). Typen er således ret udbredt i Odense, men dog ikke påvist i 24 af de 30 anlæg (80%).

Hvis smitsomheden (ud fra de foreliggende data) for *L. pneumophila* serogruppe 1 subgruppe OLDA/Oxford skal bedømmes i forhold til smitsomheden for non-serogruppe 1, så kan et forsøg på det være følgende beregning: Der var 23 anlæg med vækst af non-serogruppe 1 (23/30; 77%) og seks anlæg med vækst af serogruppe 1 OLDA/Oxford (6/30; 20%). Hvis tallene fra tabel 8 anvendes til at beregne andelen af tilfælde med non-serogruppe 1 hhv. OLDA/Oxford, så er der i alt 26 tilfælde af non-serogruppe 1 (tabel 8) og 15 tilfælde af serogruppe 1 OLDA/Oxford (ST1, ST154 og ST1017, varianter af hinanden) (tabel 8). Af de i alt 41 tilfælde var hhv. (26/41) 63% forårsaget af non-serogruppe 1 og 37% af OLDA/Oxford. Det vil sige at non-serogruppe 1 har en relativ smitsomhed på ca. $63/77=0,8$ og serogruppe 1 OLDA/Oxford har en relativ smitsomhed på $37/20=1,9$. Altså er OLDA/Oxford efter denne beregning ca. dobbelt så smitsomme som en gennemsnitlig non-serogruppe 1. Beregningen her skal naturligvis tages med stort forbehold, men stemmer godt med den almindelige antagelse at serogruppe 1 non-Pontiac generelt har en intermediær smitsomhed mellem serogruppe 1 Pontiac og non-serogruppe 1. Som nævnt i afsnittet **Typning af *L. pneumophila* og *L. pneumophila* smitsomhed** er det dog mere komplekst, idet der findes varierende smitsomhed for alle af de nævnte grupper. Det er f.eks. meget sandsynligt at serogruppe 3 ST87 har højere smitsomhed end f.eks. serogruppe 5 subgruppe Cambridge ST80, og at mange typer har meget lavere smitsomhed end både ST87 og ST80. Desuden må man ikke glemme at et højt niveau af en mindre virulent/smitsom type, kan udgøre samme risiko som lavt niveau af en mere smitsomme type.

Ved qPCR af vandprøver fra 15 ejendomme blev der påvist *L. pneumophila* serogruppe 1 i prøver fra fire ejendomme (26,6%); altså det samme niveau som ved dyrkning. I ét var der lavt niveau på 900 og 620 GU/L i henholdsvis A og B prøve, mens der var ca. 100 gange så mange *L. pneumophila* (alle typer) i begge prøver. Der blev ikke påvist serogruppe 1 ved dyrkning fra dette anlæg. Tre anlæg havde et højere niveau - to med 2.000 til 5.000 GU/L i A og B prøver. Fra det ene af disse anlæg blev serogruppe 1 også påvist ved dyrkning (trods 10 til 20 gange så mange *L. pneumophila* (alle typer)), mens der fra det andet ikke blev påvist serogruppe 1 ved dyrkning. I prøven var der imidlertid ca. 10 gange så mange *L. pneumophila*, så ved undersøgelse af 2 x 3 kolonier ved Oxoid Latex Test kan de godt overses. I det tredje anlæg var der 16.000 og 7.000 GU/L for serogruppe 1 i hhv. A og B prøver. Herfra blev der ved dyrkning kun påvist serogruppe 1 (OLDA/Oxford; 9.000 og 7.000 cfu/L for hhv. A og B prøve), og qPCR for *L. pneumophila* (hhv. 16.000 og 5.000 GU/L) viste også at der ikke var andre serogrupper i anlægget end serogruppe 1. For fire af de seks anlæg, der var dyrkningspositive for serogruppe 1, var der ikke udført qPCR, idet dette kun blev udført for hver anden ejendom.

I tabel 9 er incidencerne af dyrkningspåvist legionærsygdom forårsaget af *L. pneumophila* non-serogruppe 1 beregnet for de fire byer. Beregningen er baseret på data der er trukket fra SSIs overvågningsdatabase (tabel 7-10). For Aalborg og Esbjerg var incidencerne lige under 0,6 tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år, mens den var godt fire gange højere i Odense (2,4 tilfælde pr. 100.000 pr. år). I Randers var incidensen af non-serogruppe 1 på lidt lavere end for Odenses (tabel 9). I Randers var



det hovedsageligt ST87, mens der for Odense sås en lang række sekvenstyper associeret med sygdom. Den relativt høje forekomst af non-serogruppe 1 tilfælde i Odense (tabel 9), kan hænge sammen med at der generelt er et højere niveau af *L. pneumophila* i varmtvandssystemerne (specielt for A prøver), end der er i de andre tre byer (tabel 1, 2 og figur 8). Det skal dog bemærkes at dyrkningsraten i Aalborg og specielt Esbjerg er lavere (hhv. 44 og 30%) end for Randers og Odense (hhv. 49 og 52%), kompenseres der for dette, vil det svare til en incidens på ca. 0,6 og 1,0 for hhv. Aalborg og Esbjerg for non-serogruppe 1.

Tabel 9. Beregning af incidens af dyrkningspåvist *L. pneumophila* non-serogruppe 1 i de fire byer. Beregningen er baseret på data fra SSI (tabel 7 til 10). Incidensen er angivet som antal tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år.

Sted	Antal år	Population	Antal tilfælde	Tilfælde pr. år	Incidens
Randers	7	64.000	8	1,14	1,8
Odense	7	143.000	24	3,42	2,4
Aalborg	11	116.000	7	0,64	0,55 (0,6*)
Esbjerg	11	80.000	5	0,45	0,57 (1,0*)

* Værdier når der er korrigeret for lavere dyrkningsrat i Aalborg (44%) og Esbjerg (30%) sammenlignet med Randers og Odense.

Som konklusion: *Den høje incidens i Odense forklares ved at der i Odense blev påvist en relativ høj kolonisationsrate (83,3%) og de højeste niveauer af L. pneumophila i varmtvandssystemerne blandt de fire byer (tabel 1 og figur 8). Herudover var en relativ stor andel af systemerne koloniseret med L. pneumophila serogruppe 1 (udelukkende påvist subgruppe OLDA/Oxford). Ved dyrkning var 20% af anlæg positive for serogruppe 1 og ved qPCR var 27% positive. Den påviste type (OLDA/Oxford ST1) er den hyppigste årsag til legionærsygdom i Danmark (se afsnittet **Hvad bliver man smittet med i Danmark?**), men har tilsyneladende ikke en landsdækkende udbredelse (se afsnittene herover for Randers, Aalborg og Esbjerg). Typen har tilsyneladende en højere smitsomhed end andre *L. pneumophila* typer der hyppigt findes i varmtvandssystemer (non-serogruppe 1). Den relativt høje forekomst af non-serogruppe 1 tilfælde i Odense (tabel 9) og den store diversitet af sekvenstyper der er årsag til tilfælde (tabel 8), kan hænge sammen med at der generelt er et højere niveau af *L. pneumophila* i varmtvandssystemerne, end der er i de andre tre byer (tabel 1, 2 og figur 8). Odense adskilte sig fra de andre tre byer, ved at langt de fleste varmtvandssystemer var forsynet med varmtvandsbeholdere (se afsnittet **Karakterisering af varmtvandssystemerne**). Dette kan være eventuelt medvirkende til det højere niveau af *L. pneumophila* der er påvist i anlæg fra Odense.*

Aalborg

De overordnede dyrkningsresultater for Aalborg ligner meget dem fra Randers, der var dog en lavere rate af koloniserede anlæg på 76%, og et lidt lavere niveau af dyrkbare *Legionella* i B prøver (tabel 1 og figur 7). Andelen af positive anlæg lå lidt over det der blev påvist i Esbjerg (72%) og medianværdien for B prøver var også kun lidt over det der blev påvist i Esbjerg (tabel 1 og figur 8). Den gennemsnitlige ejendomsalder var 55 år og den gennemsnitlige ejendomsstørrelse var 41 lejligheder. Begge er lidt lavere



end i Randers. I Aalborg var der gennemført renoveringer af mange af boligerne, med det vides ikke om der også samtidigt er gennemført renovering af varmtvandssystemerne.

I vandprøver fra Aalborg blev der ikke påvist *L. pneumophila* serogruppe 1, men i lighed med Randers blev der påvist en del anlæg med serogruppe 3 (i 7 af 25 anlæg (28%)) (figur 10), men i Randers var andelen dog næsten dobbelt så høj (54%). Otte serogruppe 3 isolater blev bestemt til sekvenstype, heraf var seks ST87 (75%), ét ST371 og ét ST938 (figur 11). Det var karakteristisk for vandprøver fra Aalborg at serogruppe 5 subgruppe Cambridge var næst hyppigst påviste serogruppe (6 af 25 anlæg; 24%) (figur 10). Seks serogruppe Cambridge isolater blev alle bestemt til ST80 (ud over fra Aalborg blev samme type påvist for ét isolat fra Odense) (figur 11).

For nærmere at beskrive hvilke typer der er de hyppigste årsager til legionærsygdom i Aalborg, er der trukket data fra SSIs overvågningsregister for alle dyrkningsverificeret tilfælde af legionærsygdom (fraset rejseassocierede tilfælde) med bopæl i Aalborg (svarende til postnumre hvorfra der er udtaget vandprøver) fra 2010 til 2020 (tabel 10). I alt var der 11 tilfælde på 11 år (tabel 10) hvilket giver en Incidens af dyrkningsverificeret legionærsygdom på ca. 0,9 tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år (tabel 6).

Serogruppe 3 ST87 var således hyppigste årsag til dyrkningspåvist legionærsygdom for Indbyggere i Aalborg (tabel 8), men dog med en langt mindre hyppighed end i Randers; hhv. 0,24 og 1,12 pr. 100.000 indbyggere pr. år. Projektet her kan ikke kvantitativt (på grund af relativt få stikprøver) bedømme om der er betydelig forskel på forekomsten af ST87 i de to byer. I Randers var raten af anlæg med ST87 dog på 41,7%, mens raterne i Aalborg var på 20% (5 af 25 anlæg), desuden var koncentrationen af ST87 generelt højere i anlæggene i Randes end i Aalborg.

Tabel 10. Antal dyrkningsverificerede tilfælde af legionærsygdom for patienter med bopæl i Aalborg, 2010 til 2020. Tilfældene er sorteret efter antal patienter med de angivne typer, subsidiært om de er påvist ved smitteudredning (kolonne til højre).

Tabel 10 - Patienter Aalborg 2010 til 2020 (indbyggertal 116.000)					
Serogruppe	Subgruppe	Pontiac	ST	Antal ptt.	Påvist i vandprøver
3		NA	87*	3	1 x
1	Philadelphia	Ja	1	2	0
1	Allentown/France	Ja	82	2	0
5	Cambridge	NA	80*	1	1 x
3		NA	93	1	0
3		NA	371*	1	0
3		NA	996	1	0

* Påvist i vandprøver fra Aalborg i dette projekt (Projekt 2 – Vandprøver (figur 10))

Der var i alt fire tilfælde af serogruppe 1 Pontiac i Aalborg by (tabel 10), som igen er et meget lavere niveau end i Randers; hhv. 0,31 og 2,5 pr. 100.000 indbyggere pr. år. Serogruppe 1 Pontiac er ikke påvist i miljøprøver i Aalborg by ved smitteudredning,



men de to tilfælde med Philadelphia ST1 kunne tyde på en meget lav forekomst af denne type i vandsystemerne. Der er påvist to tilfælde af Allentown/France ST82 (tabel 8), en type vi aldrig har påvist i miljøprøver i Danmark. De to tilfælde boede tæt på hinanden og havde sygdomsdebut inden for en måned. Det er et usædvanligt sammentraf set over en 11 årig periode og kunne tyde på et lille ophobning med fælles smittekilde (antageligt en ekstern) for de to tilfælde. Det er ingen påviste tilfælde af serogruppe 1 non-Pontiac, herunder OLDA/Oxford ST1 fra Aalborg.

Serogruppe 5 Cambridge ST80 havde høj forekomst i vandprøver fra Aalborg (24%). I tabel 10 er kun angivet ét klinisk tilfælde fra Aalborg (hospitalserhvervet). Forekomsten var således på niveau med ST87 i vandprøverne men er tilsyneladende ikke årsag til samfundserhvervet smitte i denne by.

Ved qPCR for serogruppe 1 blev der ikke påvist (< 500 GU/L) anlæg med serogruppe 1 i Aalborg.

Som konklusion: *Den lave incidens af legionærsygdom i Aalborg kan ikke umiddelbart forklares ved lav kolonisationsrate eller lave niveauer af *L. pneumophila* i varmtvandssystemerne når der sammenlignes med Randers. Det kan derimod forklares ved at smitsomme typer (såsom Philadelphia ST1 og Allentown/France ST82 der er påvist fra fire patienter) sandsynligvis kun forekommer meget sjældent, samt at serogruppe 1 generelt ikke forekommer i varmtvandssystemerne. Systemerne er tilsyneladende koloniseret med typer med lav smitsomhed. Seks af de 11 påviste sekvenstyper i Aalborg har ikke, eller kun i meget få tilfælde, været årsag til legionærsygdom (tabel 3 og figur 11). Serogruppe 5 Cambridge ST80, har en ret høj forekomst i de undersøgte anlæg, men er tilsyneladende sjældent årsag til samfundssmitte, og har antagelig lav smitsomhed, resultater fra Odense giver dog noget modstridende resultater (se afsnittet om **Odense**). Serogruppe 3 ST87 har en forholdsvis stor udbredelse, men relativt til Randers kun årsag til få tilfælde (godt 4 gange lavere incidens), men dog påvist i ca. dobbelt så mange anlæg i Randers som i Aalborg.*

Esbjerg

Af de fire byer havde Esbjerg den laveste rate af positive anlæg på 72% samt de laveste medianværdier (tabel 1 og figur 7). Herudover har Esbjerg den højeste andel af anlæg med lavt indhold ≤ 1.000 cfu/L for A og B prøver på hhv. 44 og 52% (tabel 2). Gennemsnitsalderen for ejendomme i Esbjerg var 49 år, midt imellem gennemsnittet for Aalborg og Odense. Esbjerg havde den laveste gennemsnitlige ejendomsstørrelse på 33 lejligheder (tabel 4). Denne faktor kan være associeret med mindre risiko for kolonisering og høj forekomst af *Legionella* (se afsnittene **Sammenhæng mellem ejendomsalder og cfu/L** og **Sammenhæng mellem ejendomsstørrelse og cfu/ml**).

I vandprøver fra Esbjerg blev der kun påvist *L. pneumophila* serogruppe 1 ved dyrkning fra ét anlæg, isolatet blev bestemt til subgruppe Bellingham ST26 (figur 10 og figur 11), som dermed er påvist for første gang i Danmark. Den hyppigst påviste serogruppe var *L. pneumophila* serogruppe 4 subgruppe Portland, som blev påvist i seks anlæg (6/25; 24%) (figur 10). De tilhørte to forskellige sekvenstyper hhv. ST1333 (3 anlæg) og ST2005 (2 anlæg), der ikke er tæt beslægtede. ST1333 blev også påvist for to



serogruppe 10 isolater i to forskellige anlæg, så der var fem anlæg med ST1333 (Sg 4/Sg 10 ST1333; figur 11). Der er i alt kun påvist fire kliniske tilfælde i Danmark med denne ST siden 2010. Der blev kun påvist tre anlæg med serogruppe 3 (figur 10). Af tre serogruppe 3 isolater, bestemt til sekvenstype, var det ene ST87 og de to andre ST338 (figur 11). I det ene anlæg med påvist ST87 blev ST338 også påvist (ved nærmere DNA analyse tilhører ST87 og ST338 dog samme fylogenetiske klon (forstået på den måde at den genetiske variation for ST87 inkluderer ST338). Udover ST87, er der to andre sekvens typer fra Esbjerg (én serogruppe 6; ST412 og tre serogruppe 15; ST728) som er associeret med mere end fem danske tilfælde fra 2017 til 2020 (tabel 3). Begge kan være knyttet til serogruppe 6 eller 15, en del af disse tilfælde har været forbundet med hospitals/institutions smittet. Det er interessante at de fleste sekvens typer fra Esbjerg er tæt fylogenetisk relaterede. Det gælder ST87, ST338, ST421, ST728 og ST1333 (kun ST26 og ST2005 er ikke tæt beslægtede med denne gruppe, hvor ST26 er fjernest). De er fordelt på fem forskellige serogrupper (3, 4 Portland, 6, 10 og 15), men er indbyrdes kun adskilt af forskelle i et genetisk locus af de syv der bliver undersøgt, og de danner dermed en fylogenetisk enhed/cluster. *L. pneumophila* diversiteten i Esbjerg er således lille, specielt sammenlignet Odense, som har den største diversitet af de fire byer med syv forskellige fylogenetiske linjer (for isolater der er påvist i denne undersøgelse).

For nærmere at beskrive hvilke typer der er de hyppigste årsager til legionærsygdom i Esbjerg, er der trukket data fra SSIs overvågningsregister for alle dyrkningsverificeret tilfælde af legionærsygdom med bopæl i Esbjerg (for postnumre hvorfra der er taget vandprøver) fra 2010 til 2020 (tabel 11). Ligesom for de andre byer er tilfælde af rejseassocieret legionærsygdom fraregnet, der var ingen tilfælde associeret med plejecentre, og kun ét nosokomielle tilfælde (ST93).

I alt var der seks dyrkningspåviste tilfælde på 11 år i Esbjerg, hvilket giver en incidensen af dyrkningsverificeret legionærsygdom på 0,7 pr. 100.000 indbyggere pr. år. Dyrkningsraten på 30% er den laveste blandt de fire byer, hvilket gør det vanskeligt helt at vurdere årsager til legionærsygdom for denne by.

I Esbjerg spiller serogruppe 1 tilsyneladende kun en lille rolle hvis overhovedet. ST87 (og hele den fylogenetiske linje tæt beslægtet med denne ST) spiller heller ikke den store rolle, selvom de forekommer hyppigt, med kun to dyrkningspåviste tilfælde i alt (ét ST338 og ét ST1333). Der er påvist ét tilfælde af serogruppe 3 ST1609 (tabel 11) som tilhører den samme fylogenetiske linje, som er påvist i vandprøverne fra Esbjerg. ST93 er påvist hos to patienter, heraf var det ene et nosokomielt tilfælde. ST93 er den tredje hyppigste sekvenstype påvist hos patienter i Danmark (men dog kun årsag til ca. 5% af alle tilfælde der er smittet i Danmark), og er også generelt et relativt hyppigt fund i vandprøver, men ikke påvist i denne undersøgelse. Sekvens typen er ikke relateret til den omtalte fylogenetiske "ST87" linje.



Tabel 11. Antal dyrkningsverificerede tilfælde af legionærsygdom for patienter med bopæl i Esbjerg, 2010 til 2020. Tilfældene er sorteret efter antal patienter med de angivne typer, subsidiært om de er påvist ved smitteudredning (kolonne til højre).

Tabel 11 - Patienter Esbjerg 2010 til 2020 (indbyggertal 80.000)					
Serogruppe	Subgruppe	Pontiac	ST	Antal ptt.	Påvist i vandprøver
3		NA	93	2	1 x
16		NA	1333*	1	1 x
1	Benidorm	Ja	1806	1	0
3		NA	338*	1	0
3		NA	1609	1	0

* Påvist i vandprøver fra Esbjerg i dette projekt (Projekt 2 – Vandprøver (figur 11))

Ved qPCR er der af 13 undersøgte anlæg ikke påvist serogruppe 1 (<500 GU/L). Prøven der var dyrkningspositiv for serogruppe 1 Bellingham ST26 blev ikke undersøgt med qPCR. I prøven blev der kun påvist serogruppe 1 i forholdsvist lavt antal og kun i B prøven (1.000 cfu/L).

Som konklusion: *Den lave incidens i Esbjerg forklares ved at der i Esbjerg blev påvist en relativ lav kolonisationsrate og relativt lave niveauer af L. pneumophila i varmtvandssystemerne. Men det vigtigste forhold er sandsynligvis at systemerne i Esbjerg generelt er koloniseret med stammer med lav virulens/smitsomhed. Der blev påvist en evolutionære linje der inkludere ST87 og fire andre ST (plus ST1609 der er påvist hos én patienter (tabel 11). Linjen blev påvist i 11 af 25 anlæg (44%) og udgjorde 12 af 16 (75%) isolater med kendt ST, men selve ST87 blev kun påvist i et anlæg. Bedømt på antallet af patienter med dyrkningsverificeret legionærsygdom med disse sekvenstyper, må de generelt betragtes som lavvirulente.*

Generel diskussion og delkonklusioner

Resultater for dyrkning af Legionella sammenholdt med influensparametre

Legionella forekommer i alle fire byers varmtvandssystemer med stort set samme hyppighed - fra 72% i Esbjerg til 87,5% i Randers. Niveauerne (udtrykt som medianværdier) var på samme niveau i Randers og Aalborg, mens de var lavest i Esbjerg og højest i Odense. *Overordnet forklarer de målte koloniseringsraten og niveauer af Legionella ikke alene de registrerede forskelle i incidensen af legionærsygdom i de fire byer.*

Temperaturforholdene i systemerne i de fire byer var ikke betydeligt forskellige – fra et gennemsnit på 48,1°C i Aalborg til 50,8°C i Randers. *De målte temperaturene lå generelt lavt i forhold til de anbefale varmtvandstemperaturer på minimum 50°C, da 63,4% af anlæggene havde temperaturer < 50°C.* Temperaturene blev i alle tilfælde målt efter 1 minuts gennemskyling/flush (hvor B prøve også blev udtaget), hvilket burde være længe nok til at konstant temperatur er opnået ifølge Bygningsreglementets vejledning om vand (BR 18, 2021). For at kontrollere væksten



af *Legionella* og andre bakterier, er det vigtigt at $\geq 50^{\circ}\text{C}$ opnås hurtigt og på under ét min. (Health and Safety Executive, 2014; Lee, 2017).

Det blev undersøgt om der var sammenhæng mellem målt temperatur og niveauet af dyrkbare *Legionella* i prøverne. Der blev påvist en signifikant effekt af temperaturen, højere for B prøver end for A prøver, hvilket også var det forventede. For nogle B prøver blev der alligevel målt omkring 25.000 cfu/L i temperaturintervallet 52 til 55°C og for fire A prøver blev der målt > 100.000 cfu/L. *Ved temperaturer over 55°C blev der kun påvist få eller ingen Legionella ved dyrkning af B prøver.* Men der er kun få målinger i dette område, men observationen passer overens med resultater fra en undersøgelse af 97 plejecenter i Danmark (Nielsen, 2021). *Selvom der er påvist en effekt af temperaturen, er en temperaturmåling i sig selv ikke retningsgivende for om et anlæg er koloniseret, eller hvilket niveau af *L. pneumophila* der er i systemet.* En temperatur $\geq 55^{\circ}\text{C}$ ser dog ud til at være en rimelig god prædikator for et lavt niveau af dyrkbare *Legionella* i B prøver. Tapsteder (vandhaner og brusere) kan fortsat være koloniseret med *Legionella* (ses ved A prøver), men det vil så være muligt regelmæssigt at gennemskylle med temperaturer der rimeligt hurtigt dræber bakterierne.

qPCR resultater for *L. pneumophila* viste ikke den samme temperatur sammenhæng, hvilket tyder på at et anlæg kan være koloniseret og frigive døde/ikke dyrkbare bakterier ved høje temperaturer, hvilket er et forhold der ikke kan afklares ved dyrkning.

Det er interessant og overraskende, at anlæg med temperaturer $< 50^{\circ}\text{C}$ relativt oftere var negative ved dyrkning (15/66; 23%) end anlæg med temperaturer $> 50^{\circ}$ (4/38; 10,5%). Årsagen til dette kendes ikke, men det kunne være interessant nærmere at undersøge, om der er specielle forhold for disse systemer, hvor temperaturen ikke ser ud til at være den kontrollerende faktor.

Alder og størrelse af ejendommene i de fire byer adskilte sig ikke så meget fra hinanden, dog havde Esbjerg i gennemsnit de mindste ejendomme med 33 lejligheder pr. ejendom mens Odense havde de største ejendomme med 52 lejligheder pr. ejendom i gennemsnit. *I en beregning af om størrelsen af ejendommene var korreleret med Legionella kimtallet, blev det fundet at større ejendomme med > 40 lejligheder både havde en højere median for B prøver på 2.500 cfu/L og mindre andel af negative anlæg på 13% end mindre ejendomme med ≤ 40 lejligheder, hvor de tilsvarende værdier hhv. var 1.100 cfu/L og 25%. men forskellene var ikke signifikante.* Det blev ligeledes undersøgt om der var sammenhæng mellem alderen på ejendommene og *Legionella* kimtallet. Kun for ejendomme i Randers blev der påvist en signifikant sammenhæng, således at der var tendens til stigende koncentration med stigende ejendomsalder.

Varmtvandssystemerne var alle forsynet med fjernvarme. I Randers, Aalborg og Esbjerg var ingen eller få af anlæggene forsynet med varmtvandsbeholder (VVB). Her adskiller Odense sig klart fra de andre byer, ved at langt de fleste (90%) af anlæggene var forsynet med VVB og nogle af dem med beholdere i serie. Det er ikke blevet opgjort hvor store beholderne var, eller hvor mange der var serieforbundet. *Antageligt er en del af forklaringen på de ret høje niveauer af Legionella i Odense, at de fleste anlæg var forsynet med VVB.* Problemer med VVB ses specielt hvis de er



overdimensionerede i forhold til forbruget af varmt vand (Lee, 2017), hvilket ofte ses i ældre ejendomme. Desuden er det velkendt at varmtvandsbeholdere i serie kan udgøre en speciel risiko, hvis vandet i den ene beholder ikke er tilstrækkeligt varmt.

Reaktionsgrænser

Ifølge internationale retningslinjer så er grænseværdien for indhold af dyrkbare *Legionella* ofte sat til <1.000 cfu/L eller ≤ 1.000 cfu/L. og i nogle lande under dette niveau. Generelt skelnes ikke mellem A og B prøver, men i Tyskland gælder 1.000 cfu/L for det vi kalder B prøver (prøver ved konstant temperatur) (DVGW, 2002). Hvis man anvender denne grænseværdi vil mellem 48% (Esbjerg) og 63% (Odense) af anlæggene ikke overholde værdierne. Hvis denne grænseværdi skal overholde i fremtiden vil det betyde renovering og optimering af en stor del af de danske varmtvandssystemer og antageligt et højere energiforbrug til varmt vand. Selv ved en grænseværdi på 10.000 cfu/L vil 16% (Esbjerg og Aalborg) til 33% (Odense) af anlæg ikke ligge over denne værdi. Det er en overordentlig vanskelig opgave at vurdere hvilke *Legionella*-koncentrationer der udgør en sundhedsrisiko, og ud fra det fastlægge generelle grænseværdier, idet smitsomheden for de typer der kan findes i varmtvandsystemerne kan varierer meget fra sted til sted. Desuden afhænger risikoen for smitte af hvor mange der eksponeres (f.eks. offentligt tilgængelige bruseanlæg vs. private bruseanlæg) samt af hvem der eksponeres (f.eks. plejecenterbeboere vs. skolebørn). Niveauerne af *Legionella* i varmtvandssystemerne var meget ens for Randers og Aalborg, men incidensen er ca. 5 gange højere i Randers end i Aalborg. Selv hvis man frasortere tilfælde med legionærsygdom forårsaget af *L. pneumophila* serogruppe 1, har Randers fortsat en incidensrate der ca. er 3 gange højere end i Aalborg (for non-serogruppe 1) (tabel 9). Så med omtrent samme niveauer i anlæggene kan smittetrykket tilsyneladende være ret forskelligt. Sammenlagt kan en lidt højere kolonisationsrate (87,5% vs. 76%) et lidt højere medianværdi for B prøver (1.550 vs. 1.200 cfu/L), en lidt højere andel af anlæg med >10.000 cfu/L (25% vs. 16%) og en lidt højere forekomst af ST87 (op til 2 gange) tilsammen eventuelt forklare den højere incidens af *L. pneumophila* non-serogruppe 1 i Randers end i Aalborg. Disse betragtninger er på baggrund af denne begrænsede undersøgelse, som eventuelt ikke giver et helt retvisende billede af forekomsten af *Legionella* i de undersøgte byer, og skal tages med dette forbehold. Undersøgelse peger også på at forekomst af *L. pneumophila* serogruppe 1 Pontiac (ikke påvist i nogle af de 104 anlæg, men årsag til 32% (28/87) af tilfældene i de fire byer) udgør en forhøjet risiko, og kan være medvirkende til at der lokalt, som i Randers, er en høj incidensrate. Det skal dog bemærkes, at en del af disse Pontiac tilfælde sandsynligvis ikke smittes fra varmtvandssystemer i boligejendomme men fra andre kilder. Man kan eventuelt forestille sig endnu mere restriktive grænseværdier ved påvisning af virulente typer, specielt hvor beboerne er sårbare (f.eks. plejecentre) eller hvor mange benytter anlæggene (hoteller, svømmehaller, vandlande, arbejdspladser mv.). Det er midlertidig svært håndterbart, da denne analyse (subgruppebestemmelse) kun kan udføres på SSI. Alle laboratorier kan imidlertid påvise *L. pneumophila* serogruppe 1, som kunne have en lavere reaktionsgrænse end påvisning af non-serogruppe 1, som er langt de hyppigste fund.



Eksempler på grænseværdier for "potable water in piped water systems" – oversat til dansk "drikkevand" som i Danmark er koldt vand, men i andre lande omfattes også varmt vand (brugs vand).

- Frankrig: < 1.000 cfu/L - Ministère de la Sante et des Solidarités (2005)
 - Sygehuse < 100 cfu/L - generelt
 - Sygehus hvor der er patienter som er specielt i risiko < 50 cfu/L
- Tyskland: 1.000 cfu/L - varmt vand - DVGW (2004)
- Holland: 100 cfu/L - ved > 1.000 cfu/L umiddelbar handling eller nedlukning - VROM (2002)
- UK: < 100 cfu/L - ved > 1.000 cfu/L gennemgang af kontrolforanstaltninger, muligvis desinficering - HSE (2004)

Bestemmelse af *Legionella* kimtallet i B prøver er muligvis ikke den bedste indikator for smitterisiko, mens A prøver i højere grad kan være et udtryk for det. Det er bemærkelsesværdigt at medianværdierne for A prøverne for Odense lå en del over medianværdierne for de tre andre byer med ca. 2,7 gange over niveauet i Randers og Aalborg og ni gange over niveauet i Esbjerg. I dette projekt er der ikke taget prøver fra brusesystemer (som sandsynligvis er den hyppigste smittekilde i Danmark), som ofte har langt højere *Legionella*-koncentrationer end prøver fra vandhaner. Dette hænger sammen med tre ting: 1) bruseslanger der ofte er af bløde plasttyper hvor en biofilm har let ved at etablere sig, 2) termostatventiler der ofte er koloniseret med *Legionella* (og andre bakterier) og 3) at termostatventil, bruseslange og bruserhoved kun sjældent eller aldrig skylles igennem med varmt vand (> 50 °C). *Legionella*-koncentrationen i disse prøver er dog til dels uafhængige af de generelle driftsforhold, men meget afhængige af hvor ofte brusesystemet bruges, og om man sørger for regelmæssigt at skylle igennem med varmt vand. Der er derfor et stort forebyggelses potentiale i at oplyse brugere af eller ansvarlige for badefaciliteter (plejecentre, hoteller, arbejdspladser mv.) om disse forhold.

A prøver tages sjældent som led i en risikovurdering af et varmtvandssystem (som regel kun ved smitteudredninger). Det giver god mening i mange tilfælde, men steder hvor der er modtagelige personer (plejecentre og hospitaler) samt steder hvor mange bader (hoteller, sportsfaciliteter, svømmehaller) bør A prøver, herunder fra brusere, være en del af prøverepertoiret. Der er dårlig korrelation mellem resultater for A og B prøver (korrelationskoefficient R^2 på 0,2; ikke vist). Det er dog interessant, at hvis der blev påvist lave niveauer ≤ 1.000 cfu/L i A prøver (33 anlæg), så var der også ≤ 1.000 cfu/L i 32 af B prøverne (kun i én B prøve blev der målt 3.000 cfu/L). Det samme forhold gælder i øvrigt også for de højere niveauer ≤ 10.000 , ≤ 100.000 og $\leq 1.000.000$ cfu/L. Derfor er A prøver antageligt gode prøve at tage for en overordnet risikovurdering. Hvis der kun tages B prøver kan den reelle smitterisiko overses. Der er dog den ulempe ved A prøver, der undersøges ved dyrkning, at de kan indeholde høje niveauer af andre bakterier, som kan overvokse vækstsustratet og/eller være hæmmende for væksten af *Legionella*. Resultat for A prøver er dog et udtryk for niveauet i tapstedet/bruseslange/koblingsledningen og ikke nødvendigvis for cirkulationen, derfor er et højt niveau målt for A prøver ikke nødvendigvis et udtryk for højt niveau i varmtvandscirkulationen, mens et lavt niveau i A prøven ser ud til at være en god prædikator for lavt niveau i B prøven (cirkulationen).



Sammenfatning for de fire byer

Resultater fra undersøgelsen af *Legionella* niveauer og påviste typer, sammenholdt med data fra SSIs overvågningsregister for dyrkningspåvist legionærsygdom, kan være med til at give forklaringer på de forskellige incidenser der er registreret for de fire byer:

Den høje incidens i Randers kan til dels forklares ved at virulente typer af L. pneumophila (sekvenstype 1 og 42 tilhørende Pontiac gruppen) har en vis udbredelse. De er ikke påvist i vandprøver i denne undersøgelse, men er påvist i forbindelse med smitteudredninger i byen. Det er velkendt at disse typer generelt er sjældne i varmtvandssystemer, men vi havde ingen viden om den generelle udbredelse i Randers. Med dette projekt har vi sandsynliggjort at udbredelsen ikke er generel, men ved forekomst udgør disse typer tilsyneladende en forhøjet risiko for smitte. *Desuden kan den høje incidens forklares ved udbredt tilstedeværelse af L. pneumophila serogruppe 3 ST87, som blev påvist i 10 af 24 undersøgte anlæg i denne undersøgelse (41,7%), og i mange tilfælde i høje koncentrationer.* Antageligt er forekomsten ST87 højere end påvist, idet serogruppebestemmelse og sekvenstypebestemmelse kun blev udført på relativt få isolater (som stikprøver). Type antages at være relativt lidt smitsom, men dog den næst-hyppigste ST der påvises hos patienter i Danmark. Resultaterne fra dette projekt stemmer overens med at denne type er en hyppigste årsag til legionærsygdom i Randers.

Den høje incidens i Odense kan til dels forklares ved relativ høj hyppighed af L. pneumophila serogruppe 1 (non-Pontiac) i vandprøverne. Der blev kun påvist subgruppe OLDA/Oxford, som også var hyppigst årsag til legionærsygdom i byen. Ved dyrkning og qPCR for *L. pneumophila* serogruppe 1 blev serogruppe 1 påvist i hhv. 20 og 27% af undersøgte anlæg, som var et langt højere rate end i de andre byer. *Desuden blev der påvist høj koloniseringsrate og høje koncentrationer af L. pneumophila i varmtvandssystemerne (specielt i A prøver).* Ud over serogruppe 1 OLDA/Oxford er tilfælde fra Odense karakteriseret ved at have været smittet med en lang række mindre smitsomme typer. Dette kan hænge sammen med ovenstående. Kun fire, af de typer der er påvist hos patienterne i Odense de sidste syv år (20 sekvens typer), blev påvist i denne undersøgelse. Hvis sekvenstyper påvist i denne undersøgelse (10 ST) lægges sammen med sekvenstyper påvist hos patienter de sidste 7 år, kommer man op på 26 forskellige sekvenstyper, hvilket tyder på en høj diversitet af *L. pneumophila* i Odense. *L. pneumophila* ST87 blev kun påvist i to anlæg og hos to patienter, og spiller altså ikke den store rolle i Odense. *L. pneumophila* serogruppe 1 tilhørende gruppen Pontiac, er fraset et udbrud i 2015/16 ikke årsag til mange tilfælde (6 dyrkningspåviste tilfælde på 7 år). OLDA/Oxford er den serogruppe 1 subgruppe vi generelt oftest påvises i vandprøve, men som vist i dette projekt, findes den ikke med høj hyppighed i alle områder i Danmark. Hvor den er udbredt, udgør typen antageligt en højere risiko for smitte, end det generelt gælder for andre miljøassocierede *L. pneumophila* typer (non-serogruppe 1). Odense havde en høj andel af anlæg med varmtvandsbeholdere og mange store ejendomme, begge faktorer der sandsynligvis kan bidrage til de relativt høje *Legionella*-koncentrationer der blev påvist. Der kan ikke umiddelbart gives en forklaring på hvorfor forskellen til de andre byer var mest markant for A prøver.

Den lave incidens i Aalborg kan forklares ved at L. pneumophila tilhørende de mest smitsomme typer (serogruppe 1 Pontiac og non-Pontiac) kun er årsag til meget få



tilfælde af legionærsygdom i byen, og har derfor antageligt har meget lille (om nogen) forekomst i byen. *L. pneumophila* serogruppe 1 blev hverken påvist ved dyrkning eller ved qPCR i denne undersøgelse, og er heller aldrig blevet påvist ved smitteudredninger i Aalborg. Der blev påvist en relativ stor udbredelse af andre mindre smitsomme serogruppe/sekvenstyper, herunder flest serogruppe 5 Cambridge ST80 (6 af 25 anlæg; 24%) og serogruppe 3 ST87 (5 af 25 anlæg; 20%). Disse typer har dog ikke været årsag til særligt mange tilfælde i byen (fire tilfælde på 11 år) relativt til antallet af ST80 tilfælde i Odense (seks tilfælde på 7 år) og ST87 tilfælde i Randers (fem tilfælde på 7 år).

Den lave incidens i Esbjerg kan stort set forklares med samme forhold som for Aalborg. Desuden var der, i forhold til de andre byer, et relativt lavere indhold af *L. pneumophila* og en relativ lavere rate af anlæg koloniseret med *L. pneumophila*. Serogruppe 3 ST87 var mindre hyppig i vandprøver fra Esbjerg end både fra Randers og Aalborg, da det kun blev påvist i et anlæg, og heller ikke er blevet påvist hos patienter fra Esbjerg. Sekvenstyper der fylogenetiske er tæt beslægtede med ST87 (fire ud over ST87) var imidlertid ret udbredte og påvist i 11 af 25 anlæg (44%), hvilket indikerer en lille *L. pneumophila* diversitet i Esbjerg (specielt i forhold til Odense). De beslægtede stammer var fordelt på fem forskellige serogrupper (3, 4 Portland, 6, 10 og 15), hvilket viser at serogrupperbestemmelse ikke kan bruges som en fylogenetisk markør. Det vides ikke om de tæt beslægtede sekvenstyper har samme smitsomhed som ST87. *L. pneumophila* serogruppe 1 (non-Pontiac) blev kun påvist i ét anlæg, og var en type (Bellingham ST26), der ikke tidligere er påvist i Danmark.

Kvantitativ PCR (qPCR)

qPCR resultaterne for *L. pneumophila* viste en relativ god korrelation ($R^2=0,6$) med dyrkningsresultater med følgende lineære regressionsligning $y=1,597x$. Ud fra de foreliggende resultater kan qPCR bruges til at "forudsige" om et anlæg er har lavt niveau af dyrkbare *L. pneumophila*. Hvis qPCR giver værdier på ≤ 1.000 GU/L vil dyrkning i 94% af tilfældene også have værdier ≤ 1.000 cfu/L og ved værdier mellem 1.000 og 10.000 GU/L vil 98% af prøver give ≤ 10.000 cfu/L ved dyrkning. qPCR resultaterne ligger dog generelt over dyrkningsresultaterne som det fremgår af ligningen. Det gælder specielt for B prøver (i gennemsnit en faktor 2,7 større). Det hænger antageligt sammen med at der i højere grad er døde/ikke dyrkbare bakterier i B prøverne (fra cirkulationen). Dette kan specielt ses for prøver fra systemer hvor der er en høj driftstemperatur. I omkring 60% af analyser vil resultaterne for qPCR og dyrkning ligge inden for samme niveauer (se tabel 6), og for de resterende er der op til ti-gange lavere niveau ved dyrkning. *Som konklusion er qPCR en valid metode til at bedømme om et anlæg har et lavt niveau af L. pneumophila.* I en del tilfælde kan man få qPCR resultater der viser et højt niveau, men hvor samtidig eller efterfølgende dyrkning viser et langt lavere niveau af dyrkbare *L. pneumophila*. qPCR resultatet kan imidlertid give indikation på at systemet er koloniseret med *L. pneumophila*, men at bakterierne der er opsamlet i prøven er døde eller ikke dyrkbare. Årsagen til dette kan være, at temperaturen for det vand der tappes er så højt at *L. pneumophila* er ved at dø (B prøver). Imidlertid kan de være levende et andet sted i systemet, hvor temperaturforholdene er mere gunstige. Ved påvisning af høje værdier ved qPCR kan en efterfølgende dyrkning således anbefales, for at vurdere niveauet af dyrkbare *Legionella*. Resultater for qPCR og dyrkning skal sammenholdes med viden om



systemet, temperature på fremført vand, temperaturer på returstrøge, eventuelt biocid indhold, nylig varme-/biociddesinfektion, kendskab til døde ender, områder med lavt forbrug, koblingsledninger m.v. Et højt niveau (evt. >10.000 GU/L) af *L. pneumophila*, trods et eventuelt lavt niveau af dyrkbare *L. pneumophila*, bør eventuelt medføre en handling (gennemgang af systemet). Man skal være opmærksom på at der efter en varme- eller biocidbehandling kan frigives et højt niveau (eventuelt højere end før behandlingen) af døde/ikke dyrkbare bakterier og biofilm, det er således vigtigt at systemet skylles godt igennem efter en behandling.

For *Legionella* species (spp.) qPCR kunne man have samme betragtning, men alle systemer med vand er sandsynligvis positive for *Legionella* spp. (herunder også koldt vand). Langt de fleste arter kan ikke smitte mennesker eller har meget lav smitsomhed. I de fleste tilfælde kan de ikke dyrkes med standardmetode, så der ofte ingen korrelation mellem resultater for *Legionella* spp. qPCR og dyrkning. *Legionella* spp. qPCR vurderes ud fra det foreliggende ikke at kunne bidrage til en egentlig risikovurdering for vækst af potentielt patogene *Legionella*, og slet ikke hvis der ikke samtidigt undersøges for *L. pneumophila* ved qPCR. *Legionella* spp. qPCR kan dog være anvendelig i visse situationer som f.eks. ved smitteopsporing for tilfælde af *Legionella non-pneumophila* infektion. I Danmark skyldes ca. 5% af alle tilfælde med legionærsygdom andre *Legionella* arter end *L. pneumophila* (herunder forårsaget de tre arter der er påvist ved dyrkning i denne undersøgelse).

qPCR for påvisning af *L. pneumophila* serogruppe 1 kan være et vigtigt bidrag til en risikovurdering af varmtvandssystemet. Ved metoden kan niveauet vurderes og sammenhold med niveauet for total *L. pneumophila*, herunder kan det vurderes om anlægget overvejende/kun er koloniseret med serogruppe 1. Dette er ikke på samme måde muligt med dyrkning, hvor kun få af isolaterne undersøges for serogruppe, og serogruppe 1 på den måde ikke kvantificeres med sikkerhed eller kan overses. qPCR metoden kan ikke vurdere om det er en smitsom eller mindre smitsom serogruppe 1 subgrupper, det kræver dyrkning og typebestemmelse. Da kun ca. 10% (i denne undersøgelse og afhængig af geografisk lokation) af varmtvandsinstallationer er koloniseret med serogruppe 1 og alligevel er årsag til ca. 60% af danske legionellatilfælde, må tilstedeværelse af serogruppe 1 betragtes som en forhøjet risiko. En efterfølgende dyrkning og typebestemmelse af isolater kan afklare hvilken subtypen det drejer sig om. Det vil specielt være relevant for systemer hvor der er forhøjet risiko for smitte (plejecentre og badeanlæg på hoteller, svømmehaller og sportsfaciliteter).

Overordnet er de opnåede resultater i overensstemmelse med en international undersøgelse af qPCR til påvisning af *Legionella* i vandprøver (Lee, 2011). I lighed med denne undersøgelse findes der afvigelser mellem qPCR og dyrkning fra prøver fra varmt vand. Desuden blev der fundet afvigelser for prøver fra køletårne og for andre systemerne der er biocidbehandlet. For disse systemer vil qPCR ofte give langt høje værdier i forhold til dyrkning. Ligeledes blev der påvist dårlig korrelation mellem påvisning af *Legionella* spp. ved qPCR og dyrkning. Herudover skal det understreges at den herværende undersøgelse kun er vurderet for vand der ikke er behandlet med biocid og kun for vand fra varmtvandssystemer. Andre matricer kan udvise andre forhold mellem dyrkning og qPCR. Desuden er det SSIs in-house metode, der er anvendt i denne undersøgelse. Der er flere kommercielle qPCR kits til påvisning af *Legionella* på markedet, og det vides ikke om de vil give helt tilsvarende resultater,



men det er dog meget sandsynligt. I arbejdet af Lee et al. fra 2011 foreslås en reaktionsgrænse for *L. pneumophila* qPCR på 3x1.000 (3.000) GU/L som svarende til en reaktionsgrænse på 1.000 cfu/L for dyrkbare *L. pneumophila*. Denne værdi ligger tæt på 2,7x (ud fra den lineære regressionsligning $y=2,7x$), som er fundet for B prøver i denne undersøgelse. Hvis der avendes en reaktionsgrænse på 3.000 CFU/L for de 44 inkluderede anlæg, vil 50% (22 anlæg) havde værdier for B prøver under denne værdi. Atten (81%) af anlæggene havde < 1.000 cfu/L og fire anlæg havde ved dyrkning > 1.000 cfu/L (hhv. 1.100, 1.200, 1.600 og 9.000 cfu/L). For de 22 anlæg med > 3.000 GU/L, havde fire ved dyrkning < 1.000 cfu/L, de øvrige 18 havde > 1.000 cfu/L. Hvad enten der bruges en reaktionsgrænse på 2.000 (se afsnittet **Korrelation mellem dyrkning (cfu/L) og qPCR for *L. pneumophila* GU/L**) eller 3.000 GU/L, vil det i langt de fleste tilfælde være retningsgivende for lavt indhold af dyrkbare *L. pneumophila*.

Sammenligning med udlandet

Der er påvist en høj rate af anlæg koloniseret med dyrkbare *Legionella* i denne undersøgelse - fra 72 til 87,5% (83% i gennemsnit). En undersøgelse af varmtvandssystemer i 97 plejecentre i Aalborg og København, som begge områder med lav incidens, påvist en kolonisationsrate på samme niveau (75 til 92%) (Nielsen, 2021). Det er ikke let direkte at sammenligne disse fund med fund fra udlandet, da undersøgelse kan indeholde forskellige bygninger (hospitaller, institutioner, boliger, hoteller) udvalgt efter forskellige kriterier og forskellige vandprøver kan være inkluderet (f.eks. varmt-/koldt vand, vand fra kølesystemer, spa-bade mv.). Prøverne kan være udtaget forskelligt (f.eks. A el. B prøver eller begge typer eventuelt efter forskellig flush/skylle tid). Godt nok følges samme internationale standarder for dyrkning af *Legionella* (ISO 11731/ISO 11731-2) i de fleste undersøgelser, men der kan alligevel være forskel på metodernes sensitivitet – i nogle undersøgelser undersøges f.eks. kun 100 ml i andre 1000 ml (100 ml vand kan være mere sensitiv og give højere koncentrationer for A prøver end 1.000 ml, da bakteriekoncentrationen ofte vil højest i de første ml vand (Hirsh, 2020)). Desuden er der i mange undersøgelser undersøgt mere end to prøver pr. anlæg, som vi gjorde i denne undersøgelse. Følgende referencer er dog fundet relevante og kan i nogen grad sammenlignes med den herværende undersøgelse (tabel 12A). Overordnet er kolonisationsraterne langt lavere (generelt 20 – 40%) end hvad der er fundet i denne undersøgelse og undersøgelse af plejecentre i Danmark (Nielsen, 2021). Ud fra de angivne referencer tyder det på at hoteller og hospitaler har en langt højere rate af koloniserede anlæg end anlæg i beboelsesejendomme (table 12A). Trods lavere rater af koloniserede systemer i andre lande, så er andelen af *L. pneumophila* serogruppe 1 påvist ved dyrkning, i mange andre lande langt højere end påvist i den herværende undersøgelse (tabel 12B). Der kan dog være en betydelig bias da prøver kan være udtaget i forbindelse med smitteudredning eller fra specielle vandsystemer og udvælgelse af isolater kan være skrævvredet. Undersøgelse fra det nordøstlige Italien, viste til gengæld at det overvejende var serogruppe 2-15 (62,9%) frem for serogruppe 1 (35,9%) der blev påvist, men det var primært for prøver fra hospitaler, plejecentre og hoteller der var undersøgt (Antonella, 2019). Fælles for langt de fleste undersøgelser er at *L. pneumophila* serogruppe 1 sekvenstype 1 (ST1) er den dominerende serogruppe 1 type der påvises vandprøverne (tabel 12C).



Ved opgørelse af miljøisolater undersøgt på SSI var 38% af 419 undersøgte miljøisolater (ink. isolater fra dette projekt) serogruppe 1 og af serogruppe 1 var 60% ST1 og 48% var OLDA/Oxford ST1. Så af serogruppe 1 ST1 isolater var 79% OLDA/Oxford ST1 (Uldum; 2021, SSI database udtræk). Den danske opgørelse ligner således meget opgørelserne fra andre lande med hensyn til andelen af ST1 og OLDA/Oxford ST1 i miljøprøver. Andelen af serogruppe 1 er dog noget lavere end de udenlandske opgørelser viser (på nær den sidst nævnte Italienske opgørelse). Den danske opgørelse er dog betydeligt skævvredet, da langt de fleste isolater er typebestemt i forbindelse med smitteudredning. Derfor giver det et stort overestimat både for serogruppe 1 og ST1 i forhold til hvad der findes i miljøet. En interessant forskel mellem Danmark/USA på den ene side og Holland/UK på den anden side er, at i Danmark og USA er ST1 den hyppigste type isoleret fra patienter (ca. 25%) (Kozak-Muiznieks, 2012; Legionella årsopgørelse 2018/2019) mens der kun ses få kliniske tilfælde med denne type (ST1) i Holland og UK på hhv. 4% og ca. 5% (Euser, 2013; Harrison, 2009). Catalonien ligger et sted imellem med ca. 15% af ST1 (Quero, 2018). Forskelle kan ikke umiddelbart ud fra ovenstående tilskrives forskelle i den relative forekomst af denne type i miljøprøver (overvejende varmtvandsystemer), men (miljøprøverne) er ifølge opgørelser fra Holland, England også langt sjældnere koloniseret med *Legionella* end i Danmark, så forskellen er et antageligt et udtryk for at der i Holland og England relativt langt oftere påvises tilfælde med mere smitsomme Pontiac typer en i Danmark (begge lande har lavere incidens af legionærsygdom end Danmark). Man kan bruge data fra undersøgelsen fra UK (Harrison, 2009) til at estimere den relative smitsomhed for OLDA/Oxford i forhold til andre miljøtyper (non-serogruppe 1). I følge opgørelsen var der 4 kliniske tilfælde og 122 miljøisolater af non-serogruppe 1 ($4/122=3,2\%$) i forhold til 6 kliniske tilfælde og 89 miljøisolater af OLDA/Oxford ($6/86=7\%$), hvilket giver en relativ smitsomhed på $7/3,2=2,4$, hvilket er ganske lig med den relative smitsomhed på 1,9 der blev estimeret på for OLDA/Oxford med vandprøver fra Odense (se afsnittet **Diskussion af resultater for hver af de fire byer, Odense**). Der er naturligvis stor usikkerhed på disse beregninger da de er baseret på få isolater.

Tabel 12. Udenlandske undersøgelser. A. Raten af varmtvandssystemer der er positive for *Legionella* ved dyrkning. B. Raten af dyrknings-positive prøver der er positive for *L. pneumophila* serogruppe 1. C. Raten af prøver hvor der er påvist ST1 af prøver der er dyrknings-positive for *L. pneumophila* serogruppe 1.

12 A. Positiv rate for anlæg koloniseret med <i>Legionella</i>			
Land/område	Pos. rate <i>Legionella</i>	Reference	Kommentar
Holland	24%	Euser et al. 2013	Varmtvandssystemer
Italien	22,6%	Borella et al. 2004	Varmtvandssystemer
Italien	26%	Totaro et al. 2017	Varmtvandssystemer
Italien	40%	Leoni et al. 2005	Varmtvandssystemer beboelse. For hospitaler 93,7%



Nordøstlige Italien	38,3%	Antonella et al. 2019	3.585 rutineprøver, fra 471 bygninger (primært hospitaler, plejecentre og hoteller). Kun 19,8% af prøver var positive.
Polen	28,9%	Stojek et al. 2012	Varmtvandssystemer
Polen	74,8%	Sikora et al. 2015	Varmtvandssystemer. Offentlige bygninger og sygehuse
Tyskland	12%	Mathys et al. 2016	Enfamiliehuse med varmtvandsbeholdere
Tyskland	20,7%	Dilger et al. 2017	Prøver fra 13.397 Varmtvandssystemer
USA	19,3%	Moor et al. 2006	Varmtvandssystemer
Iran	27,3%	Khaledi et al. 2018	Varmtvandssystemer
Grækenland	75%	Kyritsi et al. 2018	Hoteller. Kun 25% af prøver var positive
Tyrkiet	69,6%	Erdogan et al. 2007	Hoteller
UK	8,1%	Collins et al. 2016	Brusere i beboelsesejendomme
12 B. Positiv rate for <i>L. pneumophila</i> serogruppe 1 bandt dyrkningspositive prøver			
Land/område	Pos. rate serogruppe 1	Reference	Kommentar
England og Wales	55%	Harrison et al. 2009	Varmtvandssystemer
Italien	60 %	Scaturro et al. 2020	Varmtvandssystemer
Holland	82%	Euser et al. 2013	Varmtvandssystemer
Catalonien, Spanien	83%	Quero et al. 2018	Varmtvandssystemer
Nordøstlige Italien	36%	Antonella et al. 2019	3.585 rutineprøver, fra 471 bygninger (primært hospitaler, plejecentre og hoteller). Kun 19,8% af prøver var positive.
12 C. Positiv rate af <i>L. pneumophila</i> serogruppe 1 ST1 bandt prøver positive for serogruppe 1			
Land/område	Pos. rate ST1	Reference	Kommentar
Holland	42-68%	Euser et al. 2013	Subgruppe ikke undersøgt



England og Wales	59%	Harrison et al. 2009	OLDA/Oxford
Catalonien, Spanien	40%	Quero et al. 2018	OLDA
USA	49%	Kozak-Muiznieks et al. 2012	Subgruppe ikke undersøgt

Overordnet er den epidemiologiske situation i Danmark meget anderledes end hvad udenlandske rapporter angiver, idet *L. pneumophila* non-serogruppe 1 i Danmark, og til dels også serogruppe 1 ST1, udgør et langt højere smitteandel her end i andre lande. Fra Catalonien rapporteres 100% serogruppe 1 for samfundssmitte og af disse tilhører 79% Pontiac gruppen (Quero, 2018). Fra UK rapporteres at 97,6% af alle tilfælde er forårsaget af serogruppe 1 og 91,6% tilhører Pontiac gruppen (Harrison, 2009). I Italien er non-serogruppe 1 ikke opgjort, men af serogruppe 1 tilfælde tilhører 75% Pontiac gruppen (Fontana, 2014). I Holland har man også kun undersøgt serogruppe 1. Her udføres ikke subgruppebestemmelse men kun sekvenstype-bestemmelse, og bedømt på dette skyldes mindst 77% af alle serogruppe 1 tilfælde Pontiac gruppen (Euser, 2013). I en opgørelse fra Tyskland er 74% af samfundssmittede tilfælde forårsaget af Pontiac gruppen. Her rapporteres dog om en andel på 20% af tilfælde forårsaget af non-serogruppe 1, dog kun 11% for samfundserhvervede tilfælde mens 31% er nosokomielle tilfælde (Borchardt, 2007). Fra Japan rapporteres om 80% serogruppe 1 for alle tilfælde, heraf tilhørte 80% Pontiac gruppen. Af serogruppe 1 var 10% ST1 OLDA/Oxford, og hermed den hyppigste enkelt type (Amemura-Maekawa, 2010). *Alt i alt viser det et billede af at serogruppe 1 globalt set udgør >70% af alle tilfælde og heraf tilhøre langt de fleste isolater Pontiac gruppen >75%*. For nosokomielle tilfælde rapporteres der fra flere lande, hvor det er opgjort, om en langt højere andel af non-serogruppe 1 og non-Pontiac (Cassier, 2015; Davis 2016). En ældre pan-europæisk undersøgelse viste at > 50% af nosokomielle tilfælde tilhørte denne gruppe (Helbig, 2002). Som omtalt i afsnittet **Hvad bliver man smittet med i Danmark?** og vist i figur 4 så skyldes kun 55-60% af tilfælde med samfundssmittet i Danmark serogruppe 1 og heraf op mod halvdelen non-Pontiac (så i alt ca. 30% Pontiac mod mindst 70% i andre lande). Således er andelen af non-serogruppe 1 tilfælde i Danmark på 40-50% (Legionella årsopgørelse 2018, 2019, Legionella årsopgørelse 2019, 2020) hvor opgørelser fra andre lande højst ligger på 20% (Amemura-Maekawa, 2010, Borchardt, 2007, Helbig, 2002). Incidensen af registreret legionærsygdom i Danmark er på mellem 4 og 5 tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år de sidste fire år, hvilket er blandt de tre højeste incidenser påvist i EU/EEA, hvor incidensen i gennemsnit for Europa er på lige godt 2 tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år (ECDC, 2020).

Konklusion

Den høje incidens og høje forekomst af tilfælde forårsaget af mindre smitsomme typer i Danmark, kan sandsynligvis til dels tilskrives den høje rate af anlæg der er koloniseret med *Legionella*. Den påviste rate af koloniserede anlæg i denne undersøgelse på ca. 80% er sandsynligvis retningsgivende for det generelle niveau i Danmark, hvor udenlandske undersøgelser overvejende angiver rater på omkring 20 til højst 40% for beboelsesejendomme. Herudover ligger niveauerne i over 50% af anlæggene over reaktionsniveauet på 1.000 cfu/L, der ofte angives som det maksimale niveau i



brugsvand-installationer (potable water), hvis der ikke skal være risiko for smitte (WHO, 2017). Som nævnt er kolonisationsrater og målte niveauer dog ikke direkte korreleret med de påviste incidenser. Denne undersøgelse, sammenholdt med data fra SSIs overvågningsregister, har vist at den måske vigtig faktor er hvilke typer af *L. pneumophila* der er fremherskende i de forskellige geografiske områder. I denne undersøgelse er det vist at hver by har sin egen fordeling af sero-/subgrupper og sekvenstyper (figur 10 og 11). En forekomst af virulente typer (serogruppe 1 Pontiac), som det ses i Randers, kan spille en stor rolle for smittetrykket og dermed incidensen. Dette er også tilfældet selvom udbredelsen, i henhold til resultater fra denne undersøgelse, må betragtes som sjælden. Herudover kan en udbredt forekomst af *L. pneumophila* serogruppe 1 OLDA/Oxford ST1 have indflydelse på incidensen, idet den tilsyneladende har en noget større smitsomhed end andre typer der typisk påvises i varmtvandssystemer. I denne rapport er der gjort forsøg på at estimere den relative smitsomhed for *L. pneumophila* serogruppe 1 OLDA/Oxford ST1 i forhold til gennemsnittet for andre miljøtyper (non-serogruppe 1). Beregning baseret på resultater fra Odense og tyske data giver næsten samme resultat, og viser en ca. to gange højere smitsomhed for denne type end for andre typer der hyppigt påvises i miljøprøver. Herudover kan nogle non-serogruppe 1 typer have en lidt højere smitsomhed end andre. Det kunne gælde serogruppe 3 ST87, som er det næst hyppigste fund (13%) hos patienter smittet i Danmark. Hvorvidt årsagen til de mange tilfælde er den hyppige forekomst (påvist i alle fire byer), eller om det skyldes en forhøjet smitsomhed, kan ikke afgøres ud fra det foreliggende. Den relative smitsomhed for Pontiac gruppen kan ikke beregnes, og varierer også inden for gruppen. I denne forbindelse kan det nævnes at udbruddet i Odense, hvor Knoxville ST9 var årsagen, med stor sikkerhed ikke var forårsaget af kontaminerede varmtvandssystemer. I nogle lande (herunder Holland, UK og Frankrig) er disse virulente typer (Pontiac) som nævnt langt de hyppigste årsager til legionærsygdom, og i disse lande er varmtvandssystemer heller ikke betragtet som særligt hyppige smitekilder (de har også relativt lave kolonisationsrater). Derimod er der mere fokus på alternative smitekilder som køletårne, spa-bade, renselanlæg, fontæner, forstøvere og naturlig kilder som jord, regnvand mv. Et andet forhold, der er typisk for Danmark, er at sæsonvariationen er meget lille (figur 3) sammenlignet med andre lande (ECDC, 2020), hvilket kan være forårsaget af at de overordnede smitekilder i Danmark adskiller sig fra de generelle smitekilder i udlandet. Af ukendte årsager er disse virulente typer fortsat sjældne i Danmark, men ST9 udbruddet i Odense, viser at en virulent type pludseligt kan blive introduceret/vokse op i et lokalt dansk område, eventuelt i en enkelt kilde som f.eks. i et køletårn, og være årsag til en del tilfælde.

Medvirkende til at vi i Danmark påviser relativt mange tilfælde forårsaget af typer med lavere smitsomhed (non-serogruppe 1), er sandsynligvis en meget udbredt brug af PCR. I 2019 blev 90% af alle tilfælde påvist ved PCR, og har i de sidste mange år været den mest anvendte metode til primær diagnostik af legionærsygdom i Danmark (Legionella-pneumoni 2019, 2020). PCR påviser alle serogrunder (og arter) lige godt, mens den mest anvendte metode til diagnostik i Europa fortsat er påvisning af *L. pneumophila* antigen udskilt i urin (LUT). Der findes flere kits på markedet til påvisning af *L. pneumophila* antigen, men fælles for alle er at de udelukkende eller primært påviser *L. pneumophila* serogruppe 1. Den seneste opgørelse over anvendte metoder i Europa er nogle år gammel (Beauté, 2015), men viser at 78,2% af alle europæiske



tilfælde fra 2011 til 2015 blev diagnosticeret ved LUT alene, mens der i 2015 blev anvendt PCR for kun 10,5% af tilfældene. Samme år (2015) blev knapt 80% diagnosticeret med PCR i Danmark og godt 50% med LUT (patienter kan være positive med begge metoder) (Legionella-pneumoni 2019, 2020). Man kan mene at brugen af LUT som primær diagnostisk metode, ikke kan have den store betydning for den overordnede fordeling af hvad der bliver påvist ved dyrkning, men dyrkning er kun rutinetest få steder, og der vil i mange tilfælde kun blive rekvireret prøve til dyrkning, hvis patienten har en positiv LUT. Ved PCR som primær diagnostisk metode får man antageligt et mere retvisende billede af de typer der er årsag til legionærsygdom, idet man ved positiv PCR allerede har prøvematerialet (luftvejssekret) der kan dyrkes fra. Dyrkningsraten er desuden generelt meget lav i Europa og var fra 2011 til 2015 kun på 12%, mens den i Danmark var på ca. 45% i samme periode. Siden 2015 har PCR fundet indpas i flere europæiske lande herunder i Frankrig, England, Holland, Belgien, Tyskland og Sverige, men niveauet kendes ikke, og det vides heller ikke om det har haft indflydelse på de observerede serogruppe-fordelinger i de pågældende lande.

Nærværende undersøgelsen kan ikke give et svar på, hvorfor vi har set en stigning i antal registrerede tilfælde i Danmark. Vi har ikke tilsvarende undersøgelser tilbage i tiden, som kan vurdere om der er sket en stigning i antal positive anlæg og om der er sket en stigning i koncentrationen af *Legionella* i anlæggene. Stigningen kan eventuelt til dels tilskrives at disse forhold har ændret sig, men øget testaktivitet og forbedret overvågning har også betydet at flere tilfælde registreres. Hvis øget kolonisering er en væsentlig årsag til stigningen, kan det eventuelt skyldes energibesparende tiltag over de seneste år. Selvom dette eventuelt har været en gradvis proces, kan det godt have medført spring i incidensen af legionærsygdom (som det er set fra 2013 til 2014, og igen fra 2016 til 2017), idet kun ganske få grader ændring i temperaturene i varmtvandssystemerne kan have stor betydning for væksten af *Legionella*. Større udbredelse af almindelige miljøtyper med forhøjet smitsomhed (som OLDA/Oxford ST1 og evt. ST87) kan også være en del af forklaringen, og kan hænge sammen med ovenstående hypotese. En nærmere analyse af historiske isolater sammenholdt med geografisk registrering kunne eventuelt afsløre, om der er boligområder der over tiden er blevet koloniseret med disse typer.



BOLIGFORENINGER

Tak til følgende boligforeninger for at deltage i dette projekt og være med at udvælge ejendomme og stille varmtvandssystemer til rådighed for prøvetagning.

Randers:

A/B Andelsbo og A/B Kronjylland
v/RandersBolig
Marsvej 1
DK - 8960 Randers SØ
Inspektør Gert Bach Hølund

Randers Boligforening af 1940
v/RandersBolig
Marsvej 1
DK - 8960 Randers SØ
Inspektør Flemming Lienhøft

Boligorganisationen Møllevænget & Storgaarden
v/RandersBolig
Marsvej 1
DK - 8960 Randers SØ
Inspektør Peter Pedersen

Aalborg:

Himmerland Boligforening
Rendsburggade 22
DK - 9000 Aalborg C
Energi- og Klimaspecialist Anders Kjeldsen

Esbjerg:

DAB - Dansk Almennyttigt Boligselskab, Lokalcenter Esbjerg
Storegade 33, 1.
DK - 6700 Esbjerg C
Driftchef Administrationsafd. 5 Claus T. Sørensen

Odense:

CIVICA
Carl Nielsens Kvarter 14
DK - 5000 Odense C
Driftschef Claus Jacobsen



LITTERATURLISTE

Allegra S, Grattard F, Girardot F, Riffard S, Pozzetto B, Berthelot P. (2011). Longitudinal evaluation of the efficiency of heat treatment procedure against *Legionella* spp. In hospital water systems by using a flow cytometric assay. *App Environ Microbiol.* 77(4):1268-1275. doi: 10.1128/AEM.02225-10

Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A et al. (2010). Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroup, monoclonal antibody subgroup and sequence types. *J Med Microbiol.* 59(6):653-659. doi: 10.1099/jmm.0.017509-0

Antonella F, Franchi M, De Martin S, Vitacolonna N, Iacumin L, Civilini M. (2019). Environmental surveillance and spatiotemporal analysis of *Legionella* spp. In a region of northeastern Italy (2002-2017). *PLoS ONE.* 14(7):e0218687. doi: 10.1371/journal.pone.0218687

Beauté J, Sardin S, Uldum SA, Rota MC, Brandsema P, Giesecke J, Sparén P. (2016). Short-term effect of atmospheric pressure, temperature, and rainfall on notification rate of community-acquired legionnaires' disease in four European countries. *Epidemiology and Infection.* 144(16):3483-3493. doi:10.1017/S0950268816001874.

Beauté J, on behalf of the European Legionnaires' Disease Surveillance Network (2017). Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Euro Surveill.* 22(27):pii=30566. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30566>

Borchardt J, Helbig JH, Lück PC. (2007). Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27(1):29-36. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0392-3>

BR18 Vand (2021) Bygningsregelementets vejledning om vand. Bolig- og Planstyrelsen. https://bygningsreglementet.dk/Tekniske-bestemmelser/21/Vejledninger/Vejledning_vand

Borella P, Montagne MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G et al. (2004). *Legionella* Infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis* 10(3): 457-464. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1003.020707>

Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Ginevra C et al. (2015). Epidemiological characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of legionnaires' disease cases in France. *New Microbe and New Infect.* 3(C):29-33. DOI: 10.1016/j.nmni.2014.10.006

Centers for Disease Control and Prevention (2018) *Legionella* (Legionnaires' disease and Pontiac fever). History, Burden, and Trends. <https://www.cdc.gov/legionella/about/history.html>

Collins S, Stevenson D, Bennett A, Walker. (2016). Occurrence of *Legionella* in UK household showers. *Intl. J Hygiene Environ Health.* 220(2):401-406. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.12.001>

Cassell K, Gacek P, Warren JL, Raymond PA, Cartter M, Weinberger DM. (2018). Association between sporadic legionellosis and river systems in Connecticut. *J Infect Dis.* 217(2):179-187. doi: 10.1093/infdis/jix531

Cassell K, Kjelsø C, Weinberger DM, Uldum SA. (2021). Evidence for multiple cases of recurrent *Legionella* infection: a Danish national surveillance study. *Thorax.* Epub ahead of print, January 2021. <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-216344>



- Cramp** GJ, Harte D, Douglas NM, Graham F, Schousboe M, Sykes. (2010). An outbreak of Pontiac fever due to *Legionella longbeachae* serogroup 2 found in potting mix in a horticultural nursery in New Zealand. *Epidemiol Infect.* 138(1):15-20. DOI: 10.1017/S0950268809990835
- David** S, Rusniok C, Mentasti M, Gomez-Valero L, Harris SR et al. (2016). Multiple major disease-associated clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently and independently. *Genome Res.* 26(11):155-1564. doi: 10.1101/gr.209536.116
- Dilger** T, Melzl H, Gessner A. (2018). *Legionella* contamination in warm water systems: A species-level survey. *Int Hyg Environ Health.* 221(2):199-210. doi: 10.1016/j.ijheh.2017.10.011.
- Erdogan** H, Arslan H (2007). Colonization of *Legionella* species in hotel water systems in Turkey. *J Travel Med.* 14(6):369-373. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2007.00146.x>
- European Centre for Disease Prevention and Control.** (2017). Legionnaires' disease in Europe, 2015. Stockholm: ECDC. doi 10.2900/692621
- European Centre for Disease Prevention and Control.** (2020 I) Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_Legionnaires.pdf
- European Centre for Disease Prevention and Control.** (2020 II). Surveillance Atlas of Infectious Diseases, Legionnaires' disease. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- European Standard EN 806-2.** (2005), Specification for installations inside buildings conveying water for human consumption – Part 2: Design. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/1c8a7fd3-ad0c-4b10-877a-04416895b4dd/en-806-2-2005>
- Euser** SM, Bruin JP, Brandsema P, Reijen L, Boers SA, Den Boer JW (2013). *Legionella* prevention in the Netherlands: an evaluation using genotype distribution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32:1017-1022. DOI 10.1007/s10096-013-1841-9
- Fontana** S, Scaturro M, Rota MC, Caporali MG, Ricci ML. (2014). Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical strains isolated in Italy. *Int J Med Microbiol.* 304(5-6):597-602. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.04.004>
- Gaia** V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H et al. (2005). Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 43(5):2047-2052. doi: 10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005
- Garduño** RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS. (2002). Intracellular growth of *L. pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun.* 70(11):6273-6283. doi: 10.1128/IAI.70.11.6273-6283.2002
- George** F, Shivaji T, Pinto CS, Serra LAO, Valente J, Albuquerque J, Olivenca PC, et al. (2016). A large outbreak of legionnaires' disease in an industrial town in Portugal. *Revista Portuguesa de Saúde Pública.* 34(3):199-208. <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2016.10.001>
- Gregersen** P, Grunnet K, Uldum SA, Andersen BH. (1999). Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry. *Scan J Work Environ Health.* 25(3):291-295. doi: 10.5271/sjweh.437



- Halsby** KD, Joseph CA, Lee JV, Wilkinson P. (2014). The relationship between meteorological variables and sporadic cases of legionnaires' disease in residents of England and Wales. *Epidemiol Infect.* 142(11):2352-2359. DOI: 10.1017/S0950268813003294
- Harriet** H, Bentham R, Brown MH. (2017). Legionella persistence in manufactured water systems: Pasteurization potentially selecting for thermal tolerance. *Front Microbiol.* 8:1330. doi: 10.3389/fmicb.2017.01330
- Harrison** TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. (2009). Distribution of Legionella pneumophila serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur J Clin Microbiol Infect. Dis.* 28(7):781-791. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0705-9>
- Health and Safety Executive.** (2014) Legionnaires' disease. Part 2: The control of legionella bacteria in hot and cold water systems (HSG274 Part 2). <https://www.hse.gov.uk/pUbns/priced/hsg274part2.pdf>
- Helbig** J, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia, V et. al. (2002) Pan-european study on culture-proven Legionnaires' disease: Distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21:710-716. <https://doi.org/10.1007/s10096-002-0820-3>
- Hirsh** MB, Baron JL, Mietzner SM, Rihs JD, Yassin MH, Stout JE. (2020). Evaluation of recommended water sample collection methods and impact of holding time on Legionella recovery and variability from healthcare building water systems. *Microorganisms.* 8(11):1770. doi:10.3390/microorganisms8111770
- Kenagy** E, Priest PC, Cameron CM, Smith D, Scott P et al. (2017). Risk factors for Legionella longbeachae legionnaires' disease, New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 23(7):1148-1154. doi: 10.3201/eid2307.161429
- Khaledi** A, Bahrami A, Nabizadeh E. (2018). Prevalence of Legionella species in water resources of Iran: A systematic review and meta-analysis. *Iran J Med Sci.* 43(6):571-580. PMID: 30510333
- Khodr** A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P et al. (2016). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Legionella. *Infection, Genetics and Evolution.* 43(2016):108-122. doi: 10.1016/j.meegid.2016.04.033.
- Kozak** NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor Jr TH, Shelton BG, Fields BS. (2009). Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among Legionella pneumophila serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J Clin Microbiol.* 47(8):2525-2535. doi: 10.1128/JCM.02410-0
- Kozak-Muiznieks** NA, Lucas CE, Brown E, Pondo T, Taylor Jr. JH et al. (2014). Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J Clin Microbiol.* 52(1):201-211. doi: 10.1128/JCM.01973-13
- Krøjgaard** LH, Krogfelt KA, Albrechtsen HJ, Uldum SA (2011) Cluster of legionnaires' disease in a newly built block of flats, Denmark, December 2008 – January 2009. *Euro Surveill.* 16(1):19759. PMID: 21223834
- Kyritsi** MA, Mouchtouri VA, Katsioulis A, Kostara E, Nakoulas V et al. (2018). Legionella colonization of hotel water systems in tourist places of Greece: Association with system characteristics and physicochemical parameters. *Int J Environ Res Public Health.* 15(12):2707. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122707>



Lee JV, Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S et al. (2011). An international trail of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems. *J Appl Microbiol.* 110(4):1032-1044. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04957.x

Lee S, Crespi S, et al. (2017). European Technical guidelines for the prevention, control and investigation of infections caused by Legionella species. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-technical-guidelines-prevention-control-and-investigation-infections>

Legionella-pneumoni 2015. SSI, EPI NYT uge 42/43 (2016). <https://www.ssi.dk/aktuelt/nyhedsbreve/epi-nyt/2016/uge-42-43---2016>

Legionella-pneumoni 2019. SSI, EPI NYT uge 20 (2020). <https://www.ssi.dk/aktuelt/nyhedsbreve/epi-nyt/2020/uge-20---2020>

Legionella årsopgørelse 2018 (2019): Legionella årsopgørelse 2018: Legionella-pneumoni – opgørelse over sygdomsforekomst 2018. SSI, 08 maj 2019. <https://www.ssi.dk/sygdomme-beredskab-og-forskning/sygdomsovervaagning/l/legionella-pneumoni-2018>

Legionella årsopgørelse 2019 (2020): Legionella-pneumoni – opgørelse over sygdomsforekomst 2019. SSI, 13 maj 2020. <https://www.ssi.dk/sygdomme-beredskab-og-forskning/sygdomsovervaagning/l/legionella-pneumoni-2019>

Legionella årsopgørelse 2020 (2021): Legionella-pneumoni – opgørelse over sygdomsforekomst 2020. SSI, 05 maj 2021. <https://www.ssi.dk/sygdomme-beredskab-og-forskning/sygdomsovervaagning/l/legionella-pneumoni-2020>

Leoni E, De Luca G, Legnani PP, Sacchetti R, et al. (2005). Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *J Appl Microbiol [Internet]* 98(2):373-379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02458.x>

Mathys W, Stanke J, Harmuth M, Junge-Mathys E. (2008). Occurrence of Legionella in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating. *Intl J Hygiene Environ Health.* 211(1-2):179-185. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.02.004>

Moor MR, Pryor M, Fields B, et al. (2006). Introduction of monochloramine into a Municipal water system: Impact on colonization of buildings by Legionella spp. *Appl Environ Microbiol.* 72(1):378-382. doi: 10.1128/AEM.72.1.378-383.2006

Nielsen NS, Uldum SA (2021). High Legionella colonisation rate of hot water systems in care homes from two Danish municipalities. Re-submitted 03.02.21, *Int J Environ Sci Technol.*

Quero S, Párraga-Niño N, Barrabeig I, Sala MR, Pedro-Botet ML, Monsó E et al (2018). Population structure of environmental and clinical Legionella pneumophila isolates in Catalonia. *Sci Rep.* 8(1):6241. doi: 10.1038/s41598-018-24708-1.

Scaturro M, Poznanski E, Mupo M, Blasior P, Seeber M et al. (2020). Evaluation of GVPC and BCYE media for Legionella detection and enumeration in water samples by ISO 11731: Does plating on BCYE medium really improve yield? *Pathogens.* 9(9):757. doi: 10.3390/pathogens9090757

Sharaby Y, Rodríguez-Martínez S, Oks O, Pecellin M, Mizrahi H et al. (2017). Temperature-dependent growth modelling of environmental and clinical Legionella pneumophila multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) genotyping. *App Environ Microbiol.* 83(8):e03295-16. doi: 10.1128/AEM.03295-16



Sikora A, Wojtowicz-Bobin M, Koziol-Montewka M, et al. (2015). Prevalence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 22(2):195-201. <https://doi.org/10.5604/12321966.1152064>

Slimmering JE, Polgreen LA, Hornick DB, Sewell DK, Polgreen PM. (2017). Weather-dependent risk for legionnaires' disease, United States. *Emerg Infect Dis*. 23(11):1843-1851.
doi: 10.3201/eid2311.170137

Stojek NM, Wojcik-Fatla A, Dutkiewicz J (2012). Efficacy of detection of *Legionella* in hot and cold water samples by culture and PCR. II. Examination of native samples from various sources. *Ann Agric Environ Med*. 19(2):295-298. PMID: 22742805

Svarrer CW, Uldum SA. (2012). The occurrence of *Legionella* species other than *Legionella pneumophila* in clinical and environmental samples in Denmark identified by mip gene sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 18(10):1004-1009.
doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03698.x

Totaro M, Valentine P, Coste AL, et al. (2017). Presence of *Legionella* spp. in hot water networks of different Italian residential buildings: a three-year survey. *Int J Environ Res Public Health*. 14(11):1296.
<https://doi.org/10.3390/ijerph14111296>

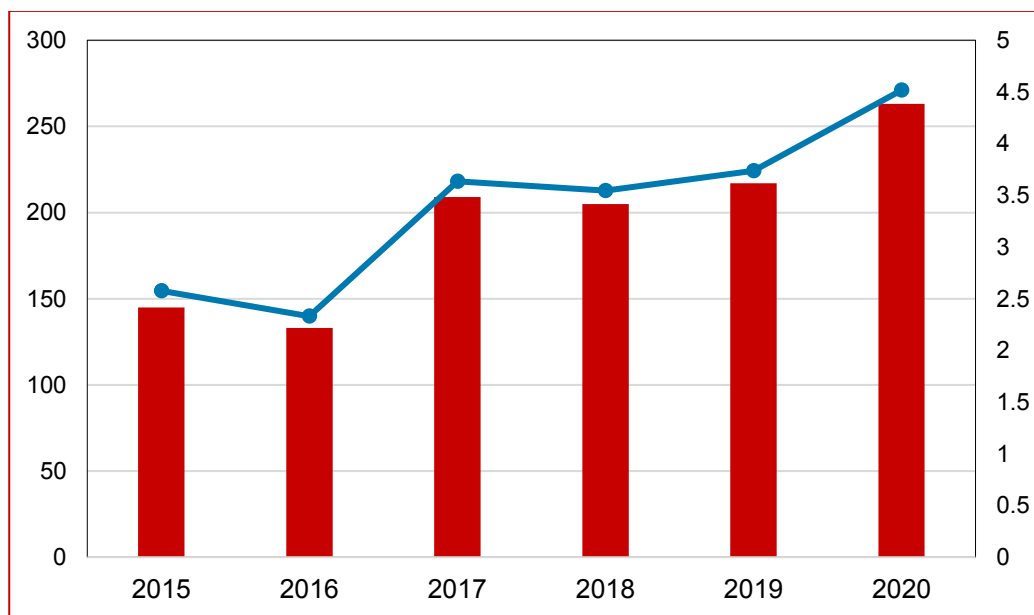
Wee BA, Alves J, Lindsay DSJ, Cameron RL, Pickering A et al. (2020). Population analysis of *Legionella pneumophila* reveals the basis of resistance to complement-mediated killing. *bioRxiv*.
doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.250670>

World Health Organization (2007). *Legionella and prevention of legionellosis*.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/43233>

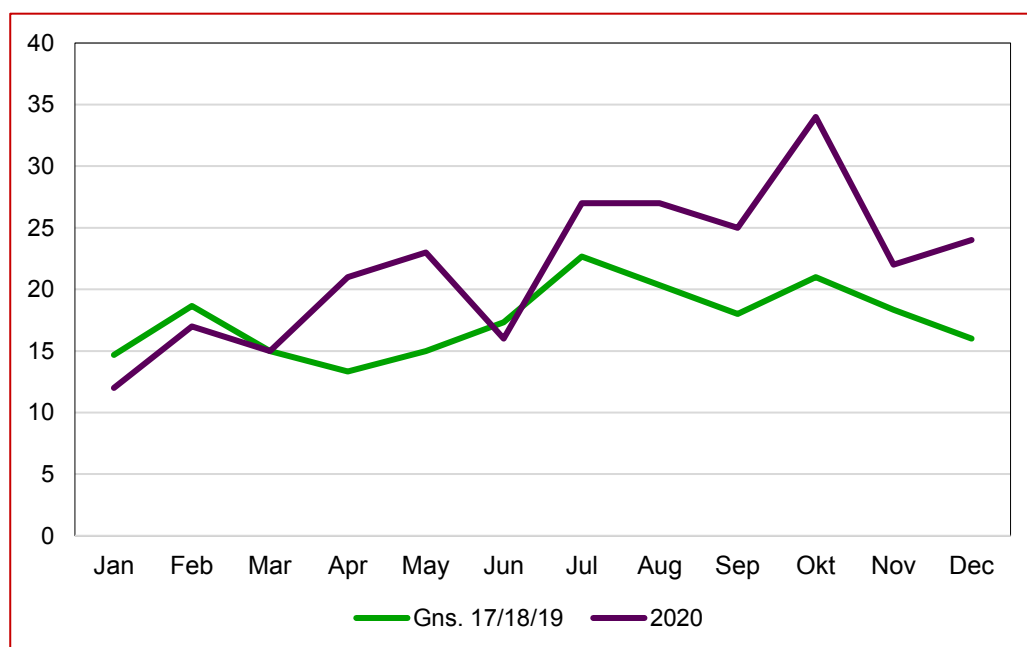


APPENDIX I

Legionella under COVID-19 pandemien, Danmark, 2020.



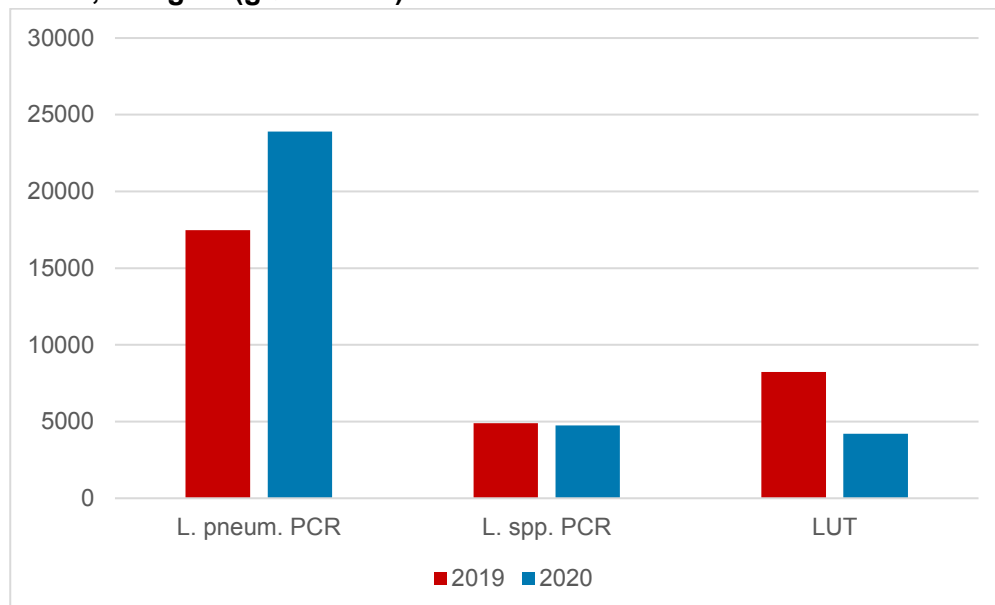
Figur 1X. Antal registrerede tilfælde med legionærsygdom erhvervet i Danmark pr. år (røde søjler) og antal registrerede tilfælde pr. 100.000 indbyggere pr. år (blå



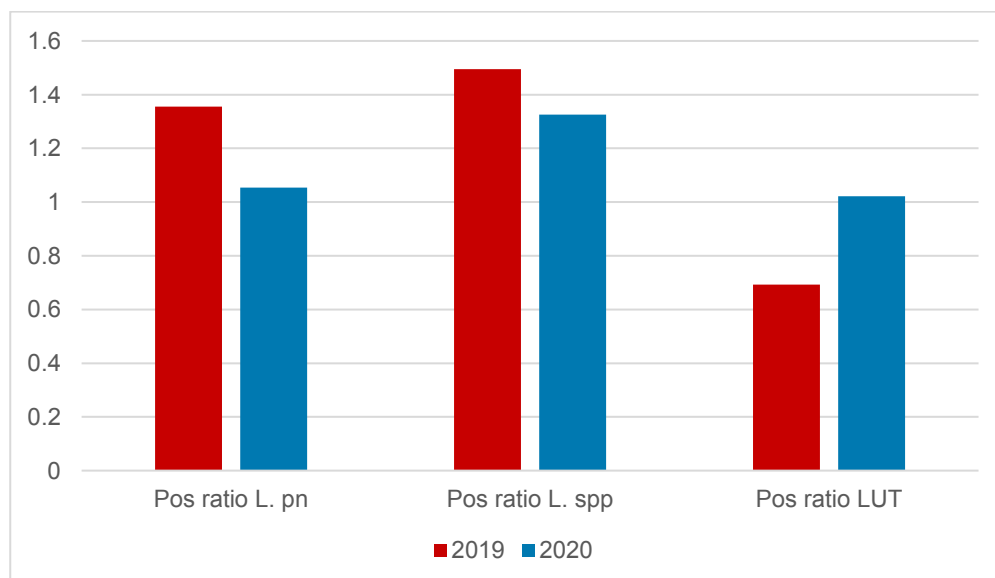
kurve, højre akse).



Figur 2X. Antal registrerede tilfælde af legionærsygdom erhvervet i Danmark pr. måned i 2020 (lilla kurve) og gennemsnitligt antal registrerede tilfælde pr. måned i 2017, 18 og 19 (grøn kurve).



Figur 3X. Antal patienter undersøgt for *Legionella*-infektion med *L. pneumophila* PCR, *Legionella* species PCR og *Legionella* urin test (LUT) i 2019 og 2020. Data fra MiBa*.

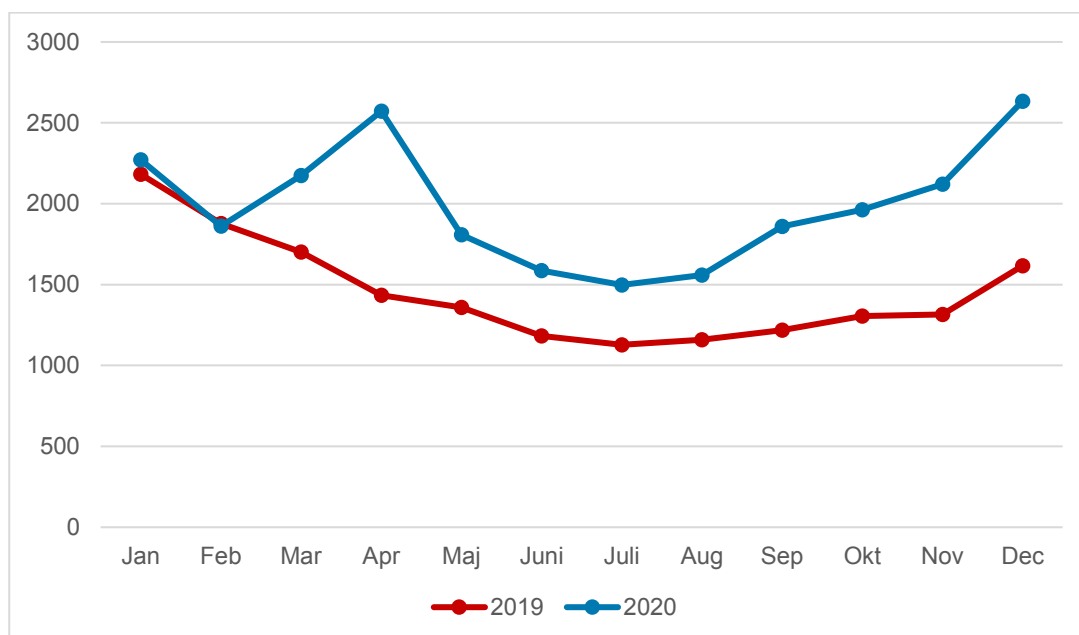


Figur 4X. Positive rater (%) for *L. pneumophila* PCR, *Legionella* species PCR og *Legionella* Urin Test (LUT) i 2019 og 2020. Data fra MiBa*.

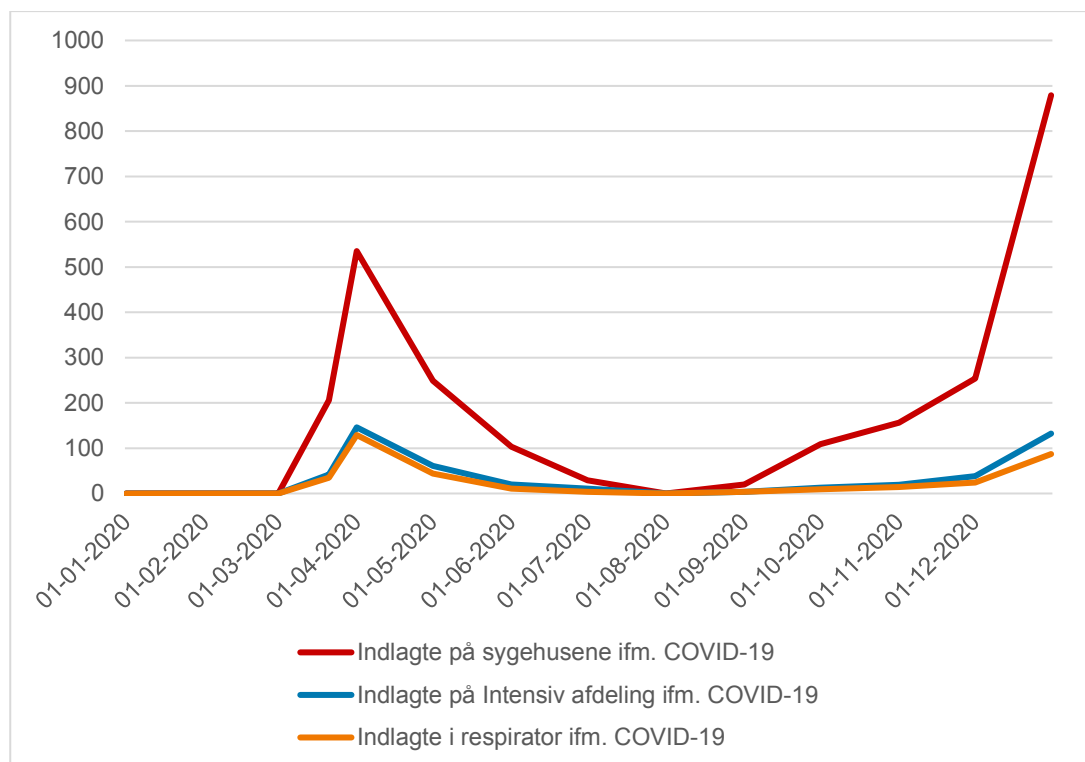
**Legionella* MiBa dataudtræk er en udført med en algoritme der primært er udviklet med henblik på at påvise positive tilfælde og ikke antal undersøgte patienter, der tages derfor forbehold for at antallene af patienter i hver kategori ikke er helt korrekte. Der er



dog anvendt samme algoritme for begge år, så eventuelle systematiske fejl vil indgå i begge udtræk, så data for de to år er direkte sammenlignelige.



Figur 5X. Antal patienter undersøgt med *L. pneumophila* PCR pr. måned i 2019 og 2020. Data fra MiBa*.



Figur 6X. Antal patienter indlagt med COVID-19 (pr. dag), 2020. Data fra Danmarks Statistik. <https://www.dst.dk/da/Statistik/covid-19-hurtige-indikatorer>



I 2020 er der i forhold til de tre foregående år set en stigning i på ca. 25% i antal registrerede tilfælde af legionærsygdom hvor smitte antageligt er sket i Danmark (figur 1X). I månederne april, maj og juli til december (specielt i november) blev der påvist flere tilfælde end gennemsnitligt i årene 2017-2019 (figur 2X). Figur 3X viser antal patienter undersøgt for *Legionella*-infektion (hver patient kan være undersøgt i mere end én test). Antallet af patienter undersøgt med *L. pneumophila* PCR er steget ca. 37% fra 2019 til 2020, mens antal patienter undersøgt med *Legionella* Urin Test (LUT) er faldet ca. 49%. Faldet for LUT er dog fra et langt lavere niveau og med en mindre sensitiv test (i forhold til PCR), og kun for 277 patienter blev der ikke samtidig udført *L. pneumophila* PCR test. Når testintensiteten stiger henholdsvis falder vil man forvente at den positive rate falder henholdsvis stiger (hvis incidensen af sygdomme er på samme niveau), hvilket figur 4x også viser for hhv. *L. pneumophila* PCR og *Legionella* Urin Test. MiBa udtrækkene er således i fuld overensstemmelse med det forventede, idet det kun er forholdet mellem tilfælde smittet i udlandet og Danmark der har ændret sig fra 2019 til 2020, men ikke det totale antal af legionærsygdom i Danmark.

Under første COVID-19 "bølge" fra marts til maj 2020 blev relativt få personer undersøgt for SARS-CoV-2, mens der under anden bølge fra september 2020 til februar 2021 var en meget højere testaktivitet. Man kan derfor ikke direkte bruge antal personer med positiv test til at sammenligne bølge et med bølge to. Antallet af indlagte tilfælde med COVID-19 giver derimod et mere retvisende billede af epidemiens udvikling (figur 6X).

Legionærsygdom er en differentialdiagnose i forhold til svære (hospitalskrævende) tilfælde af COVID-19, og det er samtidigt i høj grad samme aldersgruppe der rammes af legionærsygdom og svær COVID-19. Man vil derfor forvente, at hospitaliserede tilfælde med luftvejsinfektioner, som led i sygdomsudredningen, også vil blive undersøgt for *Legionella*. Figur 5X viser antallet af patienter undersøgt for *L. pneumophila* ved PCR pr. måned for 2019 og 2020. I januar og februar 2020 blev undersøgt samme antal som i 2019, mens der ses en stigning fra marts til april i 2020, hvor også de fleste COVID-19 tilfælde var indlagt under første bølge (figur 6X). Stigningen i antal patienter undersøgt for *L. pneumophila* fra marts til maj 2020 viser et næsten samtidigt udslag i antal registrerede tilfælde (figur 2x), dog med nogen forsinkelse, idet forårstoppe for positive *Legionella*-tests faldt i maj, hvor testaktiviteten allerede var på vej ned (figur 5X). Fordelingen af antal legionellatilfælde fra juli til december korrelerer ikke direkte til stigningen i antal undersøgte patienter (figur 5x), idet flest patienter blev undersøgt i november og december, hvor anden bølge af COVID-19 satte ind, mens det største antal patienter med legionærsygdom blev påvist allerede i oktober. Der var således ikke en direkte sammenhæng mellem testaktivitet og antal påviste tilfælde af legionærsygdom. Det skal dog bemærkes at der i hele 2020 (på nær januar og februar) var en høj testaktivitet for *Legionella*, og den har antageligt haft indflydelse på det overordnede høje antal registrerede dansk-smittede tilfælde af legionærsygdom.

Overordnet har der fra april til december 2020 været seks tilfælde flere pr. måned end for gennemsnittet for 2017 til 2019. I hele denne periode, har der været en forøget testaktivitet for *Legionella*, dette er sandsynligvis en medvirkende årsag til at der blev påvist flere dansk-smittede tilfælde af legionærsygdom i 2020 end i de tidligere år.