

利用 Selenite Brilliant Green Broth 增菌以提升糞便檢體中沙門氏菌的檢出率

林宛瑩¹, 歐柏廷², 陳詩涵², 蔡文城^{2-4*}

東吳大學微生物學系, 台北市¹; 台美檢驗科技有限公司, 新北市²; 國立陽明大學微生物及免疫學研究所³, 食品安全及健康風險評估研究所⁴, 臺北市, 台灣

摘要

學校是食物中毒的主要場所之一，政府為了要降低學校的食物中毒而推動「除四菌」的政策，藉由對學校廚工人員之糞便病原菌帶菌情形的調查以遏止供膳人員媒介食品中毒病原菌。本研究利用嗜氣運送管蒐集餐盒業者之廚工及供膳人員的糞便檢體，檢體送達實驗室後，分別利用 Gram-negative (GN) broth 及 selenite brilliant green (SBG) broth (亞硒酸鹽煌綠肉湯) 增菌 4~6 小時及 20~24 小時，再分別移植 xylose lysine desoxycholate agar (XLD) 及 eosin methylene blue agar (EMB) 分離沙門氏菌之疑似菌落，經 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry 確認後再進行血清分型試驗。本研究共檢驗 820 件糞便檢體，共分離出 65 例沙門氏菌（分離率為 7.93%），其中，以 SBG broth 增菌的檢體，皆能分離出陽性檢體中的沙門氏菌，而以 GN broth 增菌的檢體則僅能分離出其中的 5 例（分離率為 0.61%）。這些沙門氏菌分離株的血清型分別為：C2 型及 E 型各 21 株，B 型 11 株，C1 型 10 株及 D1 型 2 株。總之，本研究的結果指出廚工及供膳人員的沙門氏菌帶菌率高達 7.93% (65/820) 以及 SBG broth 的增菌效果比 GN broth 者高達 13 倍 (65:5)。吾等建議臨床微生物檢驗室將 SBG broth 應用於腹瀉糞便檢體中沙門氏菌的增菌。另外，政府有必要繼續推動「除四菌」的政策，進行學校廚房工作人員病原菌帶菌的偵測以及進行良好衛生操作規範的教育。

關鍵字：沙門氏菌、GN broth、Selenite brilliant green broth (亞硒酸鹽煌綠肉湯)、廚工

前言

2018 年衛福部統計食物中毒案件有 398 件，其中發生在學校的有 74 件，而患者人數更高達 2,485 人，其中，最近常見的致病菌有腸炎弧菌、沙門氏桿菌、病原性大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌、霍亂弧菌、肉毒桿菌等^[1]。在 2019 年 5 月及 7 月，於台北市松山區的新 O 南海鮮料理餐廳連續發生

二起食品中毒案件，人數共 28 人，經醫院通報，並採集 10 名患者檢體送疾管署檢驗，其中，共有 6 名患者檢出沙門氏桿菌相同血清型 (*Salmonella* group 09)^[2]。在台灣，台北市商業同業公會提供近百所公私立學校營養午餐，每日供應上萬份餐點。2017 年初，台北市發生一起校園集體食物中毒案件，認為是營養午餐出了問題，因此，3 月份台北市政府衛生局推動「除四菌勤洗手保食安」政策，規定校園廚房工作人員必須檢驗沙門氏菌、仙人掌桿菌、金黃色葡萄球菌及志賀氏菌四種常見食品中毒菌，若廚工帶有這些菌中的一種，須調離廚房之食品作業，然後持續監測

*通訊地址：台美檢驗科技有限公司

24890 新北市新莊區五工五路 21 號 蔡文城
電話：(02)2298-1887
E-mail address : wctsai@superlab.com.tw

追蹤，直到復檢不再檢出，始能復工。

在美國估計每年有 3,500 萬的食物中毒事件，其中 11% 是起因於非傷寒的沙門氏菌 (*nontyphoid Salmonella* spp.)，另外，因非傷寒沙門氏菌食物中毒而死亡的案例更高達 28%^[3]。沙門氏菌食物中毒主要症狀為下痢、腹痛、寒顫、發燒（高燒維持在 38~40°C）、噁心、嘔吐，症狀持續 2~3 天後會痊癒，但有 5% 的人會成為帶菌者。因此，學校營養午餐的製備過程雖然煮熟食物可消滅沙門氏菌，但仍須注意烹煮廚房工作人員及其等所接觸器具的二次污染^[4]。

Strockbine *et al.*^[5,6]指出雖然急性腹瀉患者糞便的直接接種(direct plating)可能可分離出沙門氏菌，但應用增菌肉湯更能獲得最高分離率(maximal recovery)。各種增菌肉湯通常具有高度選擇性可抑制沙門氏菌某些血清型(serotypes)，尤其是傷寒沙門氏菌(*Salmonella* serotype Typhi)。沙門氏菌的增菌培養基包括 tetrathionate broth、Rappaport-Vassiliadis broth (RV)、selenite cysteine broth (SC)、GN broth、selenite broth 等，前三種增菌肉湯常用於食品沙門氏菌檢驗的增菌培養基^[7]，而後兩者為臨床糞便沙門氏菌所常用，此係因為 selenite broth 被認為可用於同時分離傷寒沙門氏菌及志賀氏菌(*Shigella*)，但對志賀氏菌的增菌能力尚未被證實。另外，糞便檢體可能含有會被選擇性增菌培養基抑制的沙門氏菌，因此，Strockbine *et al.*^[5,6]建議必須同時將糞便檢體直接接種於非選擇性（或稱低選擇性）的增菌肉湯如 GN broth，4~6 小時後，再行移種分離培養基。從糞便中分離沙門氏菌的低選擇性分離平板培養基包括 MacConkey agar 及 EMB agar，中等選擇性包括 XLD、HE 與 CHROMagar *Salmonella* 以及高度選擇性包括 bismuth sulfite agar (BS) 及 brilliant green agar (BG)，其中，BS 較受檢驗人員喜用於分離傷寒沙門氏菌。許多檢

驗室使用 XLD 或 HE 的原因是因為此兩種培養基亦可同時用於分離志賀氏菌。^[5,6]

Chang *et al.*^[8]於 1999 年首先應用 SBG broth 增菌臨床糞便檢體的沙門氏菌然後移植 XLD 平板，此方法比直接接種方法提升 3.3 倍的沙門氏菌分離率，並指出 SBG broth 比 GN broth 的增菌效果高 2.72 倍。葉及蔡^[9]調查供膳人員腸道中沙門氏菌定植情形，結果發現配膳人員沙門氏菌的定植率為 4.7% (16/343)，並指出 SBG broth 對糞便中沙門氏菌的增菌效能比 Gram-negative broth (GN) 高 15 倍。為了再次證實 SBG broth 可提升糞便中沙門氏菌的檢出率，本研究將再次檢測廚房工作人員及供膳者之沙門氏菌帶菌率。另外，有鑑於 GN broth 為低選擇性增菌培養基，若將其移植高選擇性的 SBG broth，是否會對沙門氏菌的分離造成影響，值得進行實驗室探討。

材料與方法

糞便檢體的來源

收集餐盒業廚房工作者及供膳相關人員的 820 件糞便檢體進行測試，期間為 2019 年 8 月 1 日至 8 月 19 日。以棉拭沾取約玉米粒大小的糞便插入嗜氣運送管（啟新生技有限公司，新北市），然後以室溫方式運送至檢驗室。

試劑與培養基

本研究所使用之試劑與培養基，除沙門氏菌抗血清為 B-D 公司（美國）所生產外，其餘 GN broth、SBG broth、XLD、EMB、TSA、TSB、BAP 及各種生化試驗培養基皆購自啟新生技有限公司（新北市，台灣）。

糞便檢體的沙門氏菌檢驗

檢體的移植：將嗜氣運送管內的棉拭折斷至裝有 GN broth 管中，再以另一支無菌棉

拭沾取二次運送管內的剩餘檢體，折斷至 SBG broth。待 GN broth 培養 4~6 小時^[10]，而 SBG broth 培養 20~24 小時^[8]後，分別在 XLD 和 Eosin methylene blue agar (EMB) 進行四區畫線，然後培養在 35°C，20~24 小時後，分別觀察是否有疑似 *Salmonella* 菌落。（圖 1）

疑似菌落鑑定：將疑似菌落移種 BAP 進行純化，再以 Brucker Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) 鑑定，再將結果與傳統的表現型試驗進行比對。

MOLDI-TOF MS 鑑定系統的操作^[11]

使用前必須校正，在 96-well 的樣品盤第一格滴加 1 μL 校正標準品 Bacterial Test Standard（其結果必須為 *E. coli*），風乾後再加 1 μl HCCA 基質溶液，風乾後即可進行校正。以無菌牙籤挑取帶測菌單一菌落塗在樣品盤其他格子中，加 1 μl 70% formic acid，風乾後再加 1 μl HCCA 基質溶液，風乾後即可上機。

傳統生化試驗鑑定

利用八種生化試驗培養基，分別為 triple

sugar iron agar、citrate agar、urea agar、Sulfide indole motility semisolid medium、Voges-Proskauer semisolid medium 以及 ornithine、arginine 與 lysine decarboxylase medium，再搭配氧化酶試驗，一共獲得 14 種反應。三個反應結果轉換成一位密碼，最後得出 5 位密碼，查詢 GNB-14 電腦密碼鑑定系統^[12]即可得出相應菌種。若有必要，則進行追加試驗。

沙門氏菌血清分型^[13]

將移種 BAP 的沙門氏菌純化後，利用 *Salmonella* O Antiserum Poly A -I & Vi 作玻片凝集反應，若為陽性反應，以 *Salmonella* O Antiserum Group D1 factors 1, 9, 12 進行試驗，若為陽性，以 *Salmonella* Vi Antiserum 進行試驗，若仍為陽性，則可肯定為傷寒沙門氏菌；若 *Salmonella* Vi Antiserum 結果為陰性，則判定為 D1 型。若 *Salmonella* O Antiserum Group D1 factors 1, 9, 12 結果為陰性，則分別以 *Salmonella* O Antiserum Group A factors 1, 2, 12、*Salmonella* O Antiserum Group B factors 1, 4, 5, 12、*Salmonella* O Antiserum Group C1 factors 6, 7、*Salmonella* O Antiserum Group C2 factors 6, 8 及 *Salmonella*

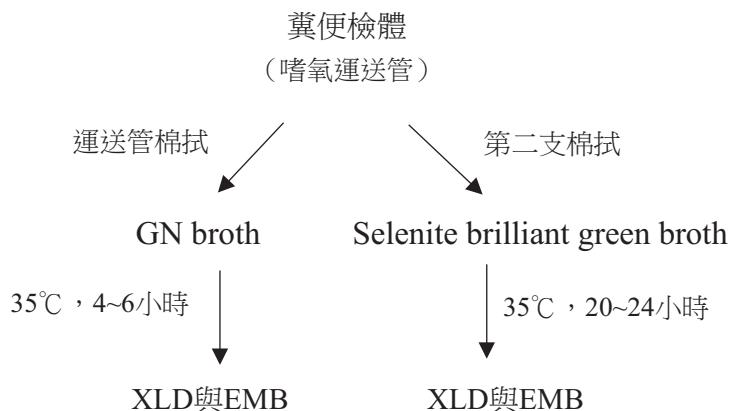


圖 1. 廚房工作與供膳人員糞便檢體分別以兩種增菌肉湯(GN broth 與 SBG broth)增菌後再移種 XLD 與 EMB 分離培養基的沙門氏菌檢測流程圖

O Antiserum Group E factors 1, 3, 10, 15, 19, 34 進行試驗。

從 GN broth 移種 SBG broth 的操作方式對沙門氏菌的增菌影響

將 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 從庫存冷凍櫃取出以 tryptic soy agar (TSA) 活化兩次，確保菌株活性。將活化後的菌株以接種環挑取其生長菌落到 TSB 中，再以可見光分光光度計調整菌液 O.D. 值（波長 600 nm）至 0.08~0.1 之間，相當於 McFarland no. 0.5 標準液（約 1.5×10^8 CFU/mL）。然後吸取 1 mL 菌液至 9 mL TSB 中，接著進行 10 倍序列稀釋，直至 10^0 CFU/mL，選擇其中約相當於 10^6 、 10^4 、 10^2 及 10^0 的菌液進行後續實驗。將 4 種不同濃度菌液以棉拭分別接種至 GN broth，培養 4~6 小時後，再以另一支棉拭沾取培養液接種至 SBG broth，培養 20~24 小時後，最後以四區畫線法移種 XLD，培養在 35°C 培養箱，20~24 小時後觀察測試菌的

生長情形。另外，四個稀釋倍數的菌液以棉拭移植至 SBG broth，同樣地，培養在 35°C，20~24 小時後移植 XLD，作為對照組。

結 果

廚房工作與供膳人員檢體的沙門氏菌帶菌率

以 SBG Broth-XLD agar 及 GN Broth-XLD agar 兩種增菌方法檢測的 820 件糞便檢體，共分離出 65 株沙門氏菌，因此，廚房工作與供膳人員的沙門氏菌帶菌率為 7.93% (65/820)。其中，GN Broth 增菌所檢出的 5 株菌均同時在 SBG Broth 的增菌檢出（表 1），因此，SBG broth 的增菌方式較 GN broth 者可提升 13 倍(65.5) 的沙門氏菌分離率。

沙門氏菌的血清型

利用 B-D 的各種沙門氏菌抗血清進行 65 株沙門氏菌分離株的血清分型，結果指出 B 型 11 株；C1 型 10 株；C2 型 21 株；D1 型 2 株以及 E 型 21 株。（表 2）

表 1. 應用兩種不同增菌培養基增菌及移植 XLD agar 及 EMB agar 的方法
分別從 820 件糞便檢體的培養分離出沙門氏菌的數目

方法或培養基	沙門氏菌分離株數目 (分離率)
SBG Broth-XLD agar 及 EMB agar	65 (7.93%)
GN Broth-XLD agar 及 EMB agar	5 (0.61%)

表 2. 本研究所分離 65 株沙門氏菌分離株的血清型分布

沙門氏菌血清型	數量及比例
B	11 株(16.9%)
C1	10 株(15.4%)
C2	21 株(32.3%)
D1	2 株(3.1%)
E	21 株(32.3%)
總數	65 株

比較 GN broth、SBG broth 及 GN broth 搭配 SBG broth 三種不同的增菌方式對沙門氏菌的增菌效果

分別將四種不同濃度的沙門氏菌菌液分別以三種增菌方式再移種 XLD agar 的方式進行測試，結果顯示當接種沙門氏菌菌數為 10 或 100 時，以 SBG broth 的增菌方式效果最佳，然而在高接種菌數(10^4 及 10^6 CFU) 則以 GN broth 的增菌方式效果最佳，接種高菌量沙門氏菌反而降低 SBG broth 對沙門氏菌的增菌數。另外，接種低菌量(10^0 或 10^2 CFU) 的沙門氏菌至 GN broth，再移種 SBG broth 的增菌方式，沙門氏菌生長菌數明顯地比 SBG broth 者少，而接種高菌量(10^4 或 10^6 CFU)，檢出效果亦低。（表 3）

討 論

SBG broth 的配方係根據 Stokes and Osborne^[14]的說明，其含有 brilliant green, selenite, 及 taurocholate 三種選擇藥劑以抑制革蘭氏陽性菌以及沙門氏菌以外的腸內菌，而 mannitol, yeast extract 及 peptone 則提供沙門氏菌生長必要的營養。至於 GN broth 配方中的 tryptose 作為營養分，Phosphates 做為緩衝劑，而 sodium citrate 及 sodium desoxycholate 對革蘭氏陽性菌具有殺菌性，並可抑制大腸桿菌群(coliform)的生長，mannitol

的濃度高於 dextrose 可限制 *Proteus* 與 *Pseudomonas aeruginosa* 的生長並促進具有發酵 mannitol 能力的沙門氏菌及志賀氏菌生長^[15]，雖如此，Croft and Miller 將 2,696 件檢體利用 GN broth 增菌 6~8 小時的研究指出可分離較多志賀氏菌，但僅分離出 3 株沙門氏菌^[16]。此可能與 GN broth 對沙門氏菌的低選擇性，導致非標的菌增生掩蓋沙門氏菌的分離。

Chang CT et al.^[8]研究中指出 SBG broth-XLD agar 與 GN broth-XLD agar 對臨床糞便檢體中沙門氏菌的分離率分別為 10.3% 與 3.8%，分離率相差 2.7 倍。然而，其等的發現並未受到臨床檢驗專家的重視，在專論文章並未提及^[5,6]。葉及蔡^[9]在 2017 年調查廚房工作及供膳人員糞便檢體的沙門氏菌帶菌率指出 SBG broth-XLD agar 與 GN broth-XLD agar 的檢出率分別為 4.4% 及 0.3%，分離率相差 14.6 倍^[9]。兩研究機構的結果均指出以 SBG broth-XLD agar 分離沙門氏菌的效能較佳。本調查總共收集了 820 份檢體，其中使用 SBG broth-XLD agar 共分離出 65 例 (7.93%) 沙門氏菌，而 GN broth-XLD agar 只分離出 5 例 (0.61%)，分離率相差 13 倍。再次證明以 SBG broth-XLD broth 的檢驗方式比 GN broth-XLD agar 者的分離效果好。

本研究指出接種低濃度純沙門氏菌至 GN broth，增菌後再將其移種 SBG broth 反而比

表 3. 分別接種不同菌量的沙門氏菌至 GN broth、SBG broth 及 GN broth 搭配 SBG broth 然後分別再移種 XLD 後之生長效能比較

接種菌量	GN broth	SBG broth	GN broth → SBG broth
10^0	1+*	4+	2+
10^2	3+	3+	2+
10^4	4+	1+	1+
10^6	4+	1+	1+

*1+ 表示 XLD 平板上移種的第一區未長滿；2+ 表示長到第二區；3+ 表示長到第三區；以及 4+ 表示長到第四區。

直接接種 GN broth 的分離效果差（表 3），此說明沙門氏菌可在 GN broth 增菌良好，當細菌增加至高濃度時，再移植 SBG broth，沙門氏菌的生長效能反而不佳。另外，直接將高菌量的純沙門氏菌移植至 SBG broth，培養後再移植 XLD agar，亦是如此。此可能所因接種高菌量的沙門氏菌可在 SBG broth 短時間內能大量生長，但養分消耗也較快，所以在培養 20~24 小時後，因營養消耗殆盡，且菌有毒的代謝產物因長時間累積，導致部分沙門氏菌死亡。此結果指出，不能同時利用兩種增菌方式檢測糞便中的沙門氏菌。

沙門氏菌血清型係依據菌體抗原（O 抗原）、表面抗原（Vi 抗原）與鞭毛抗原（H 抗原）而定，本研究利用 B-D 公司提供的沙門氏菌 O 抗抗血清群（包括 A、B、C1、C2、D、和 E 六種）進行沙門氏菌分離株，結果指出，相較於 2017 年的檢測結果，血清型 C2 和 E 型明顯地增加許多。另外，本研究亦指出供膳人員的帶菌率由 2017 年的 4.7% [9] 增加至 7.93%。

校園食品的沙門氏菌汙染來源除了供膳人員帶菌者外，許多研究顯示雞蛋、生魚片等食材中亦會帶有沙門氏菌汙染^[17]，另外，若生食與熟食的配膳沒有明確分開，更容易造成烹煮食品的二次污染。配膳人員的高沙門氏菌帶菌率，顯示衛生主管單位仍有必要持續進行廚房員工沙門氏菌帶菌率的追蹤以及進行適當的衛生教育與推動優良衛生規範的政策。

致 謝

本文承蒙杜秉勳先生協助統計檢體及分離菌株數，並提供更多資料，特於此表示謝忱。

參考文獻

- 行政院衛生福利部食品藥物管理署。歷年食品中毒資料。2019。行政院衛生福利部食品藥物管理署。台灣。<https://www.fda.gov.tw/TC/siteContent.aspx?sid=323>
- 台北市衛生局資料。
- Scallan E, Robert M. Hoekstra RM, Angulo FJ et al. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:7-15.
- 行政院衛生福利部食品藥物管理署。各類食品中毒原因介紹。沙門氏桿菌(*Salmonella*)。2010。行政院衛生福利部食品藥物管理署。台灣。<https://www.fda.gov.tw/TC/siteContent.aspx?sid=1942>
- Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Nataro JP. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed., 2015:685-713. ASM press, Washington DC, USA.
- Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed., 2015: 670-87. ASM press, Washington DC, USA
- Andrews WH, June GA, Sherrod PS, Hammack TS, Amaguana RM. *Salmonella*. In Food and Drug Administration (FDA). *Bacteriological Analytic Manual*. 8th ed. Revision A. 1998:5.01-20. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Chang CT, Yuo CY, Shen HC et al. Recovery of *Salmonella* by using selenite brilliant green sulfa enrichment broth. *J Clin Microbiol* 1999; 37:4120-3.
- 葉鳳玉，蔡文城。從盒餐業配膳人員的腸道沙門氏菌檢測探討 Selenite Brilliant Green Broth 與 GN Broth 的效能。檢驗及品保雜誌 2018; 7:55-60。
- Procop GW, Church DL, Hall GS et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 7th ed. 2017:213-315. Wolters Kluwer, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- 賴淑婷，李彥廷，陳羿樺，蔡文城。基質輔助雷射脫附游離飛行質譜儀(MALDI-TOF MS)鑑定食品病原菌及大腸桿菌群的效能。檢驗及品保雜誌 2017; 6: 83-91。
- 蔡文城，何梅純。GNB-14 電腦密碼鑑定系統-輔助常見嗜氣性及兼性厭氣性革蘭氏陰性桿菌之鑑定，初版。2006。九州圖書文物有限公司，台北，台灣。
- 蔡文城，蔡岳廷。革蘭氏陰性桿菌的鑑定。實用臨床微生物診斷學，第十一版。2017:843-5。九州圖書文物有限公司，台北。
- Stokes JL, Osborne WW. A selenite brilliant green medium for the isolation of *Salmonella*. *Appl Microbiol* 1955; 3:217-20.
- Difco. Difco manual: dehydrated culture media ad

- reagents for microbiology. 10th ed. 1985:756-8. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.
16. Croft CC, Miller MJ. Isolation of *Shigella* from rectal swabs with Hajna 'GN' broth. Amer J Clin Path 1956; 26:411-7.
17. Wang CL, Chen BY, Hsu CT et al. *Salmonella* contamination in ready-to-eat tilapia sashimi processing plants. J Food Prot 2019; 82:256-61.

Use of Selenite Brilliant Green Broth to Enhance the Detection Rate of *Salmonella* from Stool Specimens

Wan-Ying Lin¹, Po-Ting Ou², Se-Han Chen², Wen-cherng Tsai^{2-4*}

¹Department of Microbiology, Soochow University, Taipei ; ²Super Laboratory Ltd., New Taipei City ; ³Institute of Microbiology and Immunology, and ⁴Institute of Food Safety and Health Risk Assessment, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

Food poisoning is common in schools. In order to reduce food poisoning in schools and enforce the policy of "eliminating four bacteria", the health authorities of the Taipei City Government decided to detect fecal pathogenic bacteria carried by kitchen workers. In this study, we collected fecal specimens from kitchen workers and caterers in the lunch box industry using aerobic transport medium. After the specimens were delivered to the laboratory, they were inoculated in Gram-negative (GN) broth and selenite brilliant green (SBG) broth and incubated for 4-6 hours and 20-24 hours, respectively to enrich bacteria. The enriched specimens were then plated on xylose lysine deoxycholate agar (XLD) and eosin methylene blue agar (EMB) to detect *Salmonella*. Serotyping of *Salmonella* isolates was performed after identification by matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry. A total of 820 stool specimens were examined, and 65 specimens were positive for *Salmonella* (isolation rate 7.93%). The

Salmonella in all 65 specimens grew from SBG broth, but only that of 5 specimens grew from GN broth (isolation rate 0.61%). Therefore, SBG broth was much more effective than GN broth in the enrichment of *Salmonella*. Among the typable *Salmonella* isolates, 21 each were type C2 and E, 11 were type B, 10 were C1, and 2 were type D1. Results of this study indicated that the *Salmonella* carrier rate in kitchen workers and caterers in Taipei is as high as 7.93% (65/820) and that the enrichment ability of SBG broth is 13 times higher than that of GN broth (65:5). We recommend that SBG broth be used for enrichment of *Salmonella* in stool specimens from diarrheal patients. We also suggest that the policy of "eliminating four bacteria" be continued and that kitchen workers be educated for good hygiene practices.

Keywords: *Salmonella*, GN broth, selenite brilliant green broth, kitchen workers