无菌药品生产车间 CNC 区域微生物污染状况监测与风险分析

尹 姣，王 英*，杨禅堂，李 菲，胡 俊，郝鹏亮
（武汉生物制品研究所有限责任公司，湖北武汉 430207）

摘要：该研究于 2024 和 2025 年对无菌药品生产车间的 23 个“受控但未分级”（CNC）区域开展环境监测及微生物菌种鉴定。结果表明，不同功能间的污染负荷与菌群结构存在显著差异：更衣区污染程度最高，微生物占比为 43.75%，其次是人流区（33.48%）、清洁区（10.03%）、物流区（8.92%）和污物流区（3.82%）。整个 CNC 区域共检出 10 个微生物菌属，其中葡萄球菌属检出占比最高（32.14%），其后依次是芽孢杆菌属（17.86%）、念珠菌属（14.29%）和微球菌属（10.71%）。该研究建立了无菌药品生产车间 CNC 区域的污染微生物基础数据库，可为洁净区环境控制优化、清洁消毒、污染菌追溯，以及药监部门制定洁净度标准提供数据支持和科学依据。

关键词：无菌药品；受控但未分级区域；微生物污染；环境监测；菌种分析；洁净区
中图分类号：R953；R917 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-8255(2026)09-1105-06
引用：尹姣, 王英, 杨禅堂, 等. 无菌药品生产车间CNC区域微生物污染状况监测与风险分析[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(9): 1105-1110. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.09.011

Monitoring and Risk Analysis of Microbial Contamination in the CNC Area of a Sterile Pharmaceutical Production Workshop

YIN Jiao, WANG Ying*, YANG Shantang, LI Fei, HU Jun, HAO Pengliang
(*Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd., Wuhan 430207*)

ABSTRACT: This study performed environmental monitoring and microbial identification in 23 “controlled not classified”(CNC) areas of a sterile pharmaceutical production workshop from 2024 to 2025. The results indicated significant differences in contamination load and microbial community structure across different functional areas: the changing area had the highest level of contamination with a microbial proportion of 43.75 %, followed by the personnel flow area (33.48%), the cleaning area (10.03%), the logistics area (8.92%), and the waste logistics area (3.82%). The microorganisms isolated across all CNC areas were classified into 10 bacterial genera, with *Staphylococcus* being the most prevalent (32.14%), followed by *Bacillus* (17.86%), *Candida* (14.29%), and *Micrococcus* (10.71%). A baseline database of contaminating microorganisms in CNC areas of the sterile pharmaceutical manufacturing workshop was established, providing data support and scientific evidence for optimizing environmental control, cleaning and disinfection, microbial contamination traceability, and formulating cleanliness standards by pharmaceutical regulatory authorities.

Key Words: sterile drug production; controlled not classified area; microbial contamination; environmental monitoring; microbial type analysis; clean area

GMP 的核心目标之一是防止生产过程中的污染与交叉污染[1]。无菌药品生产所需的洁净区分为 A、B、C、D 级 4 个洁净度级别。我国《药品生产质量管理规范（2010 年修订）》附录 1，以及 2022 年发布的欧盟药品管理规则第 4 卷《人用和兽用医药产品良好生产规范指南》附录 1，均对洁净区均有明确的空气悬浮粒子与微生物限度标准。“受控但未分

收稿日期：2026-01-12
作者简介：尹 姣，医学生物工程师，从事药品生产与质量管理工作。
通信作者：王 英，助理研究员，从事药品研发与生产工作。

级”（controlled not classified，CNC）区域在功能上服务于洁净区，是人员和物品进入洁净区前的必经通道和缓冲地带，是防止外部污染物侵入的第一道防线，也是控制内部污染扩散的关键环节。与传统的洁净区相比，CNC 区域无需设定悬浮粒子限度，也可不进行监测，但需要进行清洁和控制[2]。虽然国内外 GMP 均未对 CNC 区域的空气洁净度作出强制性分级要求，但这类区域的“受控”状态至关重要。若 CNC 区域管控不当，极有可能成为污染物的滋生地与集散地，通过人员、物品带入，影响相邻洁净区的环境质量。

目前，行业对 CNC 区域的关注多集中于人员和物料的进出控制、更衣要求及清洁要求，对其本底微生物生态的系统性研究相对缺乏。缺乏数据支持的 CNC 区域管理往往凭经验进行，难以评估其实际风险，也无法在洁净区出现异常微生物时进行有效溯源。为探究这一问题，本研究选取了符合 GMP 要求的无菌药品生产车间，于 2024 和 2025 年两年间对其 CNC 区域开展了微生物监测。本研究旨在达成以下目标：①建立 CNC 区域典型功能间的污染微生物基础数据库；②分析 CNC 区域不同功能间的菌落数量、分布差异性及其影响因素；③鉴定菌种，评估其对洁净区的潜在风险；④为改进 CNC 区域环境控制策略提供实证依据。

1　仪器与试药

用于微生物检测培养皿培养的 20 ～ 25 ℃定温室和 30 ～ 35 ℃定温室均为本企业定制；CX23 型光学显微镜（奥林巴斯株式会社）；BPC-250F 型生化培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）；BSC-1604 Ⅱ A2 型生物安全柜（苏州安泰空气技术有限公司）；VITEK2 Compact 型全自动微生物鉴定系统（法国梅里埃公司）；BR-001 型全自动革兰染色仪（青岛澜澈生物科技有限公司）。

胰酪大豆胨琼脂培养基（浙江天杭生物科技股份有限公司，批号 23308721B、23308311A，直径分别为 90 和 55 mm）；样本稀释液（批号 C1394A01）、革兰阳性细菌鉴定卡（批号 2422571203）、革兰阴性细菌鉴定卡（批号 2412455103）、酵母菌鉴定卡（批号 2432898103）、芽胞菌鉴定卡（批号 2392931203）、奈瑟菌及嗜血杆菌鉴定卡（批号 2452901203）、厌氧菌及棒状杆菌鉴定卡（批号 2442946103）、棒状杆菌鉴定卡（批号 2462572503）均购自法国梅里埃公司；革兰染色液（青岛澜澈生物科技有限公司，包含草酸铵结晶紫、碘液、番红染色液，批号 GSJ231204）；95%乙醇（吉林省新天龙实业股份有限公司）；84 消毒液（批号 20230801，规格 500 g，氯含量 4.05%～ 5.55%，蚌埠科卫消毒药剂有限公司）；杀孢子剂［批号 1000286456，规格 1.2 kg/L，奥星衡迅生命科技（上海）有限公司］。

2　方法与结果

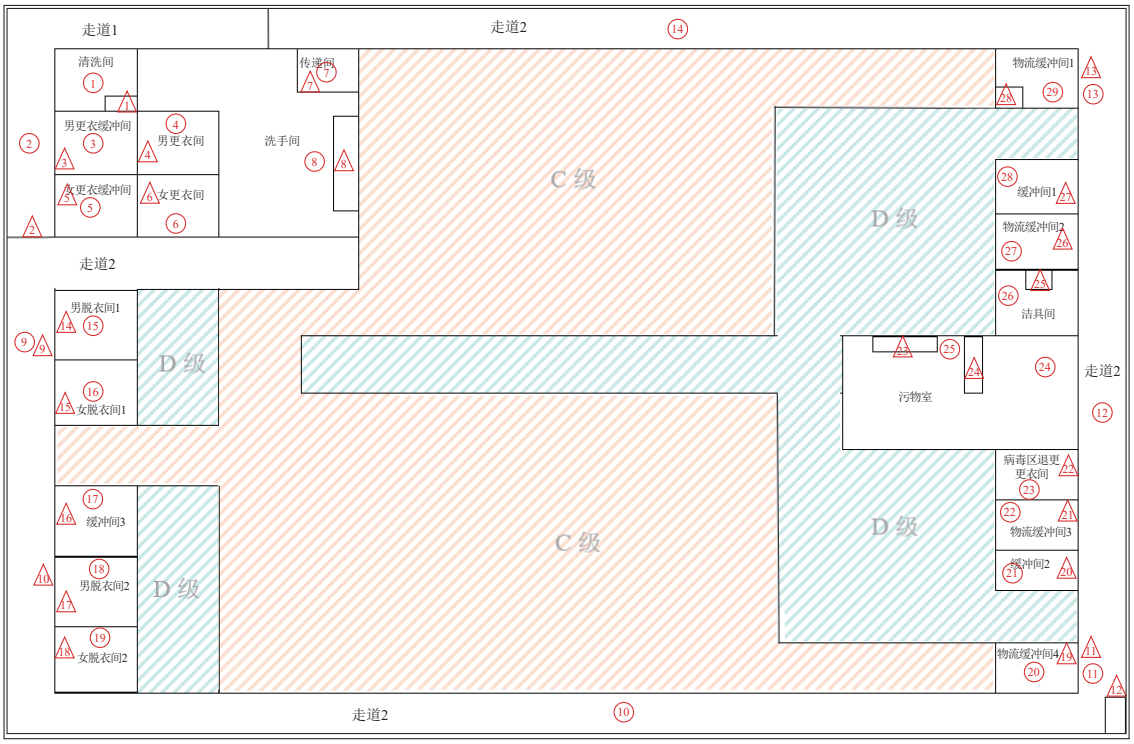
2.1　监测位点与指标选择

通过对某无菌药品原液生产车间环境的监测和风险评估，确定 CNC 区域的环境监测位点和监测指标。该车间 CNC 区域包括更衣区（男更衣缓冲间、男更衣间、女更衣缓冲间、女更衣间、洗手间、男脱衣间 1、女脱衣间 1、男脱衣间 2、女脱衣间 2、病毒区退更更衣间）、清洁区（清洗间、洁具间）、人流区（走道 1、走道 2、缓冲间 1、缓冲间 2、缓冲间 3）、物流区（传递间、物流缓冲间 1、物流缓冲间 2、物流缓冲间 3、物流缓冲间 4）、污物流区（污物室），共计 23 个功能间。参考《药品生产质量管理规范（2010 年修订）》附录 1 中“洁净度级别及监测”的要求，选取沉降菌和表面微生物 2 个代表性指标进行监测；监测点布置在人流和物流流通频繁处，沉降菌监测位点共计 29 个，表面微生物监测位点共计 28 个；2024 和 2025 年两年间每季度监测 1 次。车间平面布局及监测位点示意图如图 1 所示。

2.2　沉降菌与表面微生物的监测方法

采用沉降法，按 GB/T 16294—2010《医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法》的要求收集空气中的活微生物粒子。将直径 90 mm 的胰酪大豆胨琼脂培养基置监测位点处，在距离地面 0.8 ～ 1.5 m 处取样，取样暴露时间不少于 3.75 h、不超过 4 h。设置空白对照。取样完毕后，按 ChP 2025 年版四部通则 9205“药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则”的要求，将胰酪大豆胨琼脂培养基和空白对照倒置，于 20 ～ 25 ℃定温室中培养 3 d，之后转移至 30 ～ 35 ℃定温室，再倒置培养 2 d，观察并计数。

采用接触碟法收集物品（包括环境、设施设备）



注：沉降菌监测位点在房间里，表面微生物监测位点在门、门把手、墙面、设备等表面位置（其中，9、10、11、13号位点表示“走道 2”功能间的门把手，12号位点表示该区域的小推车表面）。

□—CNC 区域；▨—C 级洁净区；▨—D 级洁净区；◯—沉降菌监测位点；△—表面微生物监测位点。

图 1　车间平面布局及监测位点示意图

Fig.1　Schematic Diagram of Workshop Layout and Monitoring Points

表面的活微生物。将直径 55 mm 的胰酪大豆胨琼脂培养基的凸面，沿培养基边沿缓慢贴靠被测物品表面，使培养基直接贴合待测采样位置并保持均匀接触，接触时长不少于 10 s，随后盖上平皿盖。同时，设置空白对照。取样完毕后，将胰酪大豆胨琼脂培养基和空白对照倒置，于 20 ～ 25 ℃定温室中培养 3 d，之后转移至 30 ～ 35 ℃定温室，再倒置培养 2 d，观察并计数。

2.3　菌种鉴定

待检菌的分离和纯化：挑取沉降菌和表面微生物中形态、颜色、形状和大小不同的菌落，分别接种至 90 mm 胰酪大豆胨琼脂培养基上，连续划线分离和纯化，依据 ChP 2025 年版四部通则 9204 中列出的现行版《伯杰氏系统细菌学手册》中关于分离、纯化、培养与鉴定的核心要求，将菌株于适宜的温度倒置培养 18 ～ 24 h，或直至长出足够量菌株，以获取待检菌的新鲜纯培养物。

形态观察：待达到培养时间或培养基上长出清晰可辨、大小适中的单菌落时，观察并记录菌落形态特征。

革兰染色：挑取纯菌落，涂布于载玻片上，经火焰固定，加草酸铵结晶紫染色 1 min，水洗；加碘液染色 1 min，水洗；加 95% 乙醇，不停摇动载玻片 10 ～ 30 s，直至无紫色脱落，水洗。加番红染色液，复染 1 min，水洗。样品量多时使用全自动革兰染色仪进行染色。待载玻片自然干燥，或用滤纸吸干后，镜检。

微生物鉴定：取纯化的菌落，采用全自动微生物鉴定系统进行菌种鉴定。

2.4　不同季节的微生物监测结果

于 2024 和 2025 年连续对 CNC 区域的环境微生物进行监测，每季度 1 次。按图 1 所示监测位点

和“**2.2**”项下方法，对沉降菌和表面微生物进行取样和培养；将微生物总数定义为沉降菌与表面微生物之和，菌落数按季度汇总后，对各季度微生物总数进行统计分析。结果如表 1 所示。第一、第二和第三季度的微生物总数均落在年度微生物总数范围内，提示这 3 个季度监测结果波动较小，未呈现显著性差异；第四季度的微生物总数落在年度微生物总数范围外，且数值明显低于前 3 个季度，差异显著（P<0.05）。

微生物数量主要受车间人员与物品进出频次的影响，而进出频次与生产活动密切相关。因不同时期生产任务的差异，微生物数量出现波动。此外，本研究涉及的 CNC 区域均通过空调系统控制车间环境温湿度，因此受季节变化（如第二和第三季度的梅雨季和高温季）的影响较小，未观察到外部环境温湿度升高导致微生物数量显著增加的现象。这进一步说明，第四季度微生物总数显著低于前 3 个季度的原因主要与生产活动有关，而非季节因素。

表 1　CNC 区域的微生物监测结果

Tab.1　Microbiological Monitoring Results of the CNC Areas

监测项目	第一季度	第二季度	第三季度	第四季度	年度均值 [1)]
4 h 内沉降菌数量 /CFU	276	209	291	275	—
每皿表面微生物数量 /CFU	141	235	155	43	—
微生物总数 /CFU	417	444	446	318	406±60

注：[1)] 表示 23 个功能间沉降菌与表面微生物的菌落数总和的年度均值，沉降菌、表面微生物不单独做统计分析。

2.5　不同区域的微生物监测结果

为系统评估 2024 和 2025 年各区域的污染微生物分布特征，以各区域微生物总数为观测值，各区域微生物总数的均值为期望值（表 2），进行卡方拟合优度检验，从而验证不同区域的微生物负载是否存在统计学差异。整体差异检验结果显示，各区域微生物差异具有极显著的统计学意义（P<0.001）。更衣区（43.75%）与人流区（33.48%）的微生物数量显著高于理论均匀分布水平（标准化残差分别为 +21.4 与 +12.1），表明人员是最大污染源；污物流区（3.82%）的微生物负载显著低于其他区域（标准化残差为 －14.6），这主要归因于污物流区的污物都经过消杀处理，不会产生大量微生物；物流区（8.92%）与清洁区（10.03%）的微生物负载水平较为接近，且均处于较低水平，标准化残差无显著偏离，推测这与物品在进入 CNC 区域前严格执行了脱包清洁程序有关，提示该操作能有效降低外来物品带入的微生物负载。

表 2　2024 和 2025 年 CNC 区域不同功能间的微生物监测结果

Tab.2　Microbial Monitoring Results of Different Functional Areas in the CNC Areas in 2024 and 2025

监测区域	4 h 内沉降菌数量 /CFU	每皿表面微生物数量 /CFU	微生物占比 [1)]/%	微生物总数 /CFU		标准化残差
				观测值	期望值 [2)]	
更衣区	562	149	43.75	711	325	+21.4
人流区	295	249	33.48	544		+12.1
清洁区	91	72	10.03	163		－9.0
物流区	76	69	8.92	145		－10.0
污物流区	27	35	3.82	62		－14.6

注：[1)] 微生物占比 = 该区域的沉降菌和表面微生物总数 / 所有区域的沉降菌和表面微生物总数 ×100%；[2)] 微生物总数的期望值 = 所有区域的沉降菌和表面微生物总数 / 区域数量。

2.6　微生物菌属分类

在 2024 和 2025 年，按“**2.1**”项下的监测位点及频次和“**2.2**”项下方法对沉降菌和表面微生物进行取样和培养，共收集到 1 625 株菌，按“**2.3**”项下方法进行菌种鉴定。对每个胰酪大豆胨琼脂培养基上菌落的数量、形态、大小及颜色进行分类，并对其中 28 类主要微生物菌落进行鉴别。基于菌种鉴定结果，依据《伯杰氏系统细菌学手册》进行菌属分类，将整个 CNC 区域内的污染微生物划分为 10 个菌属（表 3）。污染菌中占比最高的菌属为葡萄球菌属（32.14%），其后依次是芽孢杆菌属（17.86%）、念珠菌属（14.29%）、微球菌属（10.71%）。这些菌属广泛存在于 CNC 区域，大部分为常见菌。

企业曾对消毒剂的消毒效力进行验证。结果显示，杀孢子剂、1% 84 消毒液和 75% 乙醇可用于聚氯乙烯、不锈钢、彩钢、玻璃、橡胶材料的表面消毒，且杀孢子剂和 1% 84 消毒液还可用于受到细菌及其芽孢、真菌污染的材料的表面消毒；75% 乙醇

仅可对受到不含芽孢的细菌及真菌污染的表面进行消毒。75%乙醇对葡萄球菌属有较好的消杀效果[3]，而杀孢子剂及1% 84消毒液对芽孢杆菌属、念珠菌属、微球菌属有较好的消杀效果[3-5]。以上污染微生物均可通过正常更衣和物品转运的清洁消毒流程达到良好控制。

表3 2024和2025年在CNC区域检出的微生物种类

Tab.3 Microbial Species Isolated in the CNC Areas in 2024 and 2025

微生物属名	检出次数	占比/%
葡萄球菌属	9	32.14
芽孢杆菌属	5	17.86
念珠菌属	4	14.29
微球菌属	3	10.71
考克菌属	2	7.14
乳杆菌属	1	3.57
短杆菌属	1	3.57
节杆菌属	1	3.57
谷氨酸杆菌属	1	3.57
土杆菌属	1	3.57
总计	28	100

对CNC区域不同功能间检出的微生物进行菌属分类，更衣区和人流区的污染微生物菌属种类较多，清洁区、物流区和污物流区的属种类较少，表明人员带入的微生物较为复杂（表4）[6]。

2.7 微生物类型分布分析

对“**2.6**”项下的污染微生物鉴定结果进行类型分布分析，结果如图2所示。CNC区域的污染微生物主要为革兰阳性菌，占比90.48%，其中革兰阳性杆菌占比42.86%，革兰阳性球菌占比47.62%，两者占比相当；还有少量真菌（占比9.52%），无革兰阴性菌。该结果进一步说明CNC区域的微生物污染主要来自人员。

表4 各功能间检出的微生物属种类

Tab.4 Number of Microbial Genera Isolated in Each Functional Area

区域	微生物属名	微生物菌属种类
更衣区	葡萄球菌属、芽孢杆菌属、念珠菌属、微球菌属、乳杆菌属、谷氨酸杆菌属	6
人流区	葡萄球菌属、念珠菌属、微球菌属、考克菌属、短杆菌属、节杆菌属、土杆菌属	7
清洁区	芽孢杆菌属、念珠菌属、葡萄球菌属	3
物流区	葡萄球菌属、芽孢杆菌属	2
污物流区	考克菌属、芽孢杆菌属	2

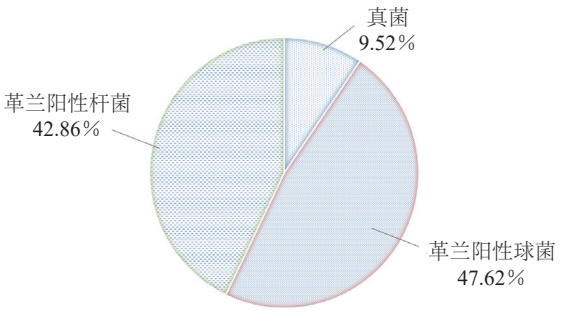


图2 CNC区域微生物类型分布

Fig.2 Distribution of Microbial Types in CNC Areas

3 讨论

3.1 CNC区域的微生物污染特征与风险启示

本研究数据证实，CNC区域并非一个均质地带，各功能间存在微生物差异。更衣区为整个CNC区域的污染核心区，其菌落数量与人员行为规范（如更衣规范、洗手效果）、人流频率直接相关。该区域的微生物污染数据如果异常升高，可作为人员操作不符合要求或培训失效的早期预警信号。

3.2 对洁净区保护的启示

屏障有效性评估：CNC区域作为洁净区的屏障，当其微生物负荷激增时，会增加污染突破的概率。CNC区域的监测数据可为屏障的有效性评估及洁净区域清洁消毒策略的调整提供依据。

污染追溯依据：本研究建立了CNC区域污染微生物基础数据库，使污染菌追溯从洁净区延伸至CNC区域。当洁净区检出特定污染菌时，可对照CNC区域的基础数据库进行排查。例如，若检出表皮葡萄球菌，可重点检查人员更衣情况，这能大幅提升调查的精准度和效率。

清洁消毒策略的优化：本研究结果显示，当前CNC区域不同功能间采用的统一清洁频率和消毒剂轮换策略存在优化空间，需要调整。例如，可提高更衣区域的清洁消毒频率，降低微生物负载；针对芽孢杆菌属，需在常规消毒剂基础上增加杀孢子剂处理[4]。以数据为支撑的、基于风险的分

区分类管理模式，可提升微生物污染控制策略的科学性。

3.3 管理建议

企业可基于自身历史数据，为 CNC 区域不同功能间设定内部质量控制标准，当发生异常趋势时及时进行调查。建议将 CNC 区域微生物监测数据纳入车间的环境监测年度报告，当洁净区出现微生物监测数据偏差时，可同步对相关 CNC 区域开展回顾性数据审查。本研究通过对无菌药品生产车间 CNC 区域微生物的系统性监测与分析，观察到 CNC 区域内部存在复杂的微生物生态系统，其污染水平与人员和物品活动紧密相关。其中，更衣区作为高污染风险点，应予以较高关注。

本研究结果证明，对 CNC 区域进行科学、常态化的微生物监测，不仅能建立其环境本底，更能为洁净区的污染控制提供前瞻预警和回溯调查的线索。将 CNC 区域纳入基于风险的无菌药品生产环境管理体系，是实现全过程污染控制、提升 GMP 管理水平的必然要求。未来可深入解析 CNC 与洁净区之间的微生物迁移规律，构建更加精准和智能的药品生产环境防控网络。

参考文献：

[1] 黎阳, 高德进, 陶博, 等. 无菌药品生产环境监测性能确认的研究及应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(8): 1063-1069.

[2] 沈晋明, 刘燕敏. 无级别受控环境理念与应用——生物洁净技术发展新趋势 [J]. 暖通空调, 2021, **51**(6): 29-34.

[3] 刘蓉, 赵晓冬, 王丹, 等. 药品微生物检验洁净室中常见环境菌的消毒效果研究 [J]. 质量安全与检验检测, 2024, **34**(6): 87-91.

[4] 潘静, 黄奕烨, 卢勉飞, 等. 洁净区杀孢子剂的消毒效果验证 [J]. 食品与营养科学, 2025, **14**(1): 77-83.

[5] 陈宝宝, 雷毅, 蒋丽娟, 等. 两种 84 消毒液稳定性及杀菌效果观察 [J]. 中国消毒学杂志, 2021, **38**(12): 890-891.

[6] 刘卫德, 刘绪平, 熊骏, 等. 无菌药品生产洁净车间环境菌鉴定与溯源分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2019, **50**(11): 1335-1340.

