

## 1. FINALIDADE

O ágar chocolate é um meio enriquecido e não seletivo para cultivo de bactérias sensíveis e exigentes

### Registro ANVISA:

10097010-137

### Apresentação:

540158 – CHOCOLATE ENRIQ.-AGAR-20mL-PL90X15-10PL  
540198 - BIPLACA-CHOCOLATE ENR.-AGAR-2X10mL-10PL

LB 172066  
Rev. 10 – 07/2022

## 1. INTRODUÇÃO

O ágar Chocolate consiste em um meio enriquecido com suplemento VX de forma a favorecer o crescimento de diversos patógenos fastidiosos como *Haemophilus* spp. e *Neisseria* spp. isolados de materiais clínicos nobres (LCR, aspirados invasivos), ou não (sangue, secreções) entre outros. A adição de bacitracina no meio, facilita o desenvolvimento de espécies como *Haemophilus* spp., promovendo leve inibição a alguns microrganismos de microbiota.

Indicado para a pesquisa clínica de microrganismos fastidiosos em amostras de origem nobre e em amostras de secreções.

Carpenter e Morton descreveram um meio melhorado para o isolamento do gonococo em 24 horas. A eficácia deste meio, Agar GC suplementado com hemoglobina e concentrado de levedura, foi demonstrada num estudo de doze meios utilizados na altura para o isolamento deste microrganismo. A BBL® melhorou o meio substituindo o concentrado de levedura pelo suplemento de enriquecimento IsoVitalX Enrichment®, um suplemento definido quimicamente, desenvolvido especialmente para auxiliar o crescimento de gonococos, embora seja amplamente aplicado a outros microrganismos como, por exemplo, o *Haemophilus* spp. e *Streptococcus pneumoniae*.

## 2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/L
Hidrolisado pancreático de caseína	7,5
Peptona de carne	7,5
Fosfato dipotássio	4,0
Fosfato monopotássico	1,0
Amido de milho	1,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar Base	13,0
Hemoglobina	10,0
Suplemento VX	10 mL
Água deionizada	1L
pH 7,3 ±0,2 a 25°C	

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho do produto.

## 3. AMOSTRA

### a- Tipos de amostras

- Podem ser utilizadas amostras clínicas como: urina, secreções, sangue e outros fluidos corpóreos, materiais biológicos diversos, amostras ambientais ou quaisquer outras amostras passíveis de conter os microrganismos com capacidade de se desenvolver neste produto.

- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.

- Sempre considerar as necessidades específicas dos microrganismos alvos das análises, microrganismos com necessidades especiais (suplementos específicos ou ambiente controlados) podem não apresentar crescimento adequado se semeados em meio de cultura que não apresente os requisitos mínimos.

### b- Precauções e cuidados especiais

- Produto destinado ao uso diagnóstico *in vitro*;

- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado.

- Antes de descartar o material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Para acondicionamento do material usado, recomendamos o uso do Detrilab.

## 4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

### a- Princípio

O meio contém nutrientes nitrogenados na forma de caseína e peptonas de carne, tampão de fosfato para manter o pH e amido de milho, que neutraliza os ácidos graxos tóxicos que podem estar presente no agar. A hemoglobina fornece fator X (hemin) e o aquecimento libera o fator V (nicotinamida adenina dinucleotide NAD) para o desenvolvimento das espécies de *Haemophilus* spp. O enriquecimento fornece uma maior concentração dos fatores V e X, além de vitaminas, aminoácidos, co-enzimas, dextrose, íon férrico e outros fatores que melhoram a recuperação de microrganismos fastidiosos, como *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp.

### b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório as placas devem ser armazenadas em temperatura de 2 a 12°C, condições em que se mantêm estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. O uso de refrigerador tipo *frost-free* não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

Considerando que este produto é gelatinoso e sua composição pode apresentar até 80% de água, ao sofrer variações de temperatura (quente-frio ou frio-quente) todo meio de cultura pode gerar condensação, de pouca a muita, acumulando água na placa. Recomenda-se guardar as placas com os meios de cultura virados para cima e, quando necessário, desprezar a água acumulada e deixar o meio de cultura estabilizar a temperatura antes de sua utilização.

Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina e deixar estabilizar a temperatura, ou secar a água condensada, antes de sua utilização, em temperatura ambiente, podendo utilizar a incubação em estufa ( $\pm 37^\circ\text{C}$ ) para redução do tempo de secagem ou estabilização. A repetição do processo de refrigeração/estabilização não é recomendada, a constante troca de temperatura pode levar a desidratação do meio, expor o produto a contaminações ou gerar um acúmulo de água excessivo.

A água acumulada por condensação, ocasionada por alguma variação de temperatura, não influencia no desempenho do produto, desde que este não apresente ressecamento ou diminuição de espessura.

Devido a presença de substratos sensíveis, recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

### d- Precauções e cuidados especiais

- O produto destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;

- Uso restrito por profissionais;

- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;

- Não inalar ou ingerir;

- Não utilizar placas com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para “Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A” para o manuseio seguro;
- O procedimento de descarte do produto se baseia na RDC 222 (ANVISA) de 28 de março de 2018, que regulamenta as boas práticas de gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde.
- Para acondicionamento do material a ser autoclavado, recomendamos o uso dos sacos para autoclavagem - Detrilab.
- Contate o serviço de vigilância sanitária de sua região para garantir o cumprimento correto da legislação de descarte de produtos potencialmente contaminantes.

**5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)**

- Estufa bacteriológica;
- Alças bacteriológicas;
- Bico de Bunsen;
- Sistema de geração de CO<sub>2</sub>;
- Jarra herméticamente fechada para tensão de CO<sub>2</sub>.

**6. PROCEDIMENTO TÉCNICO**

- a- Retirar o pacote da refrigeração e, em ambiente asséptico, separar as placas a serem usadas, devolvendo o restante ao refrigerador;
- b- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35±2°C pelo tempo necessário para adquirir esta temperatura, ou deixar estabilizar/secar em temperatura ambiente;
- c- Usando procedimentos adequados, proceder a inoculação do material diretamente na superfície do meio;
- d- Incubar o material em estufa bacteriológica entre 35±2°C /18 a 24h. A utilização de geradores de ambiente (CO<sub>2</sub>, anaerobiose ou microaerofilia) é fundamental para o desenvolvimento de microrganismos neste meio de cultura, devendo se utilizar o ambiente correto para a bactéria alvo. Consulte a literatura para verificar a classificação dos microrganismos quanto à necessidade de ambiente controlado.
- e- Após a incubação, verificar o crescimento e a ocorrência de hemólise se for o caso (evidenciada através da visualização de um halo ao redor da colônia);
- f- Devido a exigências especiais, alguns microrganismos podem necessitar de um período maior de incubação, se não ocorrer o crescimento nas primeiras 24 horas, ou caso o crescimento apresentado não seja o suficiente, incubar o material sob tensão de CO<sub>2</sub> em estufa bacteriológica entre 35±2°C, por mais 18-24h;
- g- Após o total desenvolvimento das colônias, proceder com os processos de identificação conforme estabelecido em seu laboratório;
- h- A avaliação microscópica de colorações de Gram da amostra e, se necessário, da colônia analisada pode elucidar dúvidas e oferecer um melhor direcionamento para o processo de identificação.

**7. RESULTADOS**

*Relatório*

- Não houve crescimento:  
“Ausência de crescimento microbiano na amostra analisada após 24/48h de incubação a 35°C”;
- Havendo crescimento:  
“Nome do microrganismo (indicar bactéria identificada). Contagem de colônias (indicar resultado) UFC/mL”. (apenas quando aplicável)

*Morfologias típicas das colônias em ágar Chocolate:*

Microrganismo	Morfologia
<i>Haemophilus influenzae</i>	Dimensões pequenas (1 mm), úmidas, aspecto de pérola e odor característico
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Dimensões pequenas (1 a 2 mm), de incolores a brancas acinzentadas e mucóides
<i>Neisseria meningitidis</i>	Dimensões de médias a grandes (2 a 8 mm), incolores a levemente cinzas, por vezes apresentam uma tonalidade azulada, mucóides
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Colônias baixas, de dimensões pequenas

	(1 a 3 mm), habitualmente brilhantes, com coloração esverdeada
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Colônias redondas, convexas, opacas, dimensões pequenas (1 a 3 mm), colorações variando entre cinza claro a levemente esverdeado, quando tocadas deslizam sobre o meio de cultura permanecendo intactas

- Esquemas de identificação:

Coloração de Gram: a presença de cocos ou diplococos gram negativos em amostras do trato respiratório é fundamental para o direcionamento das provas bioquímicas.

Espécie*	Glicose	Sacarose	Maltose	Lactose	ONPG
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	-	+	-	-
<i>Neisseria flavescens</i>	-	-	-	-	-

\*As espécies de *Neisseria* apresentam Catalase e Oxidase positivas.

Espécies <i>H. influenzae</i> *	Glicose	Ribose	Ornitina	Indol	Urease
<i>Biotipo I</i>	+	+	+	+	+
<i>Biotipo II</i>	+	+	-	+	+
<i>Biotipo III</i>	+	+	-	-	+
<i>Biotipo IV</i>	+	+	+	-	+
<i>Biotipo V</i>	+	+	+	+	-
<i>Biotipo VI</i>	+	+	+	-	-
<i>Biotipo VII</i>	+	+	-	+	-
<i>Biotipo VIII</i>	+	+	-	-	-

\*Todos os biótipos de *H. influenzae* apresentam resultados para Sacarose e Lactose negativos.

Espécie	Catalase	α-hemólise	Optoquina	MTS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	+	Sensível	-

Espécie	Catalase	Oxidase	Colônias móveis	MTS
<i>Moraxella catarrhalis</i>	+	+	SIM	-

Os esquemas de identificação sugeridos foram obtidos em literatura especializada, cabe ao laboratório definir o processo de identificação que melhor atende sua necessidade e rotina.

**8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO**

*(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 35/2015)*

- A utilização de suplementos químicos delicados na formulação pode acarretar leve foto sensibilidade, recomenda-se proteger o produto da incidência direta da luz.
- Uma vez que este meio não é seletivo, outros agentes patogênicos, ou não, poderão se desenvolver, considerando que muitos microrganismos possuem afinidade pelos suplementos e são resistentes a bacitracina. Para casos que apresentem crescimento de múltiplos microrganismos, recomenda-se a utilização de meios seletivos para um melhor isolamento.
- Algumas variações de coloração na colônia, morfologia, tamanho ou intensidade de hemólise pode ocorrer, devido a características únicas da cepa analisada.
- A presença de mais de uma variante genética intrínseca a cepa analisada, pode interferir nas características de crescimento. É possível que características únicas ou mutadas das cepas possam interferir no desempenho do meio de cultura afetando ou retardando o total desenvolvimento das colônias.
- Inóculos com excesso de carga bacteriana podem interferir na avaliação de resultados.
- A presença de mais de um microrganismo na amostra pode ocasionar sobreposição de colônias na superfície do meio de cultura, dificultando sua identificação, para estes casos, recomenda-se o reisolamento das colônias diferentes, mantendo a contagem da placa inicial.

- A qualidade dos resultados de análises microbiológicas são intimamente ligados a qualidade da amostra, as melhores práticas pré-analíticas, como cuidados extremos com a assepsia do processo ou paciente, garantem um melhor resultado.

- Embora possam ser realizados alguns testes de diagnóstico diretamente neste meio de cultura, é necessária a realização de testes bioquímicos para uma completa identificação e, se indicado, a realização de testes imunológicos usando culturas puras. Consultar a bibliografia apropriada para mais informações.

- Os resultados falso-negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de coleta inadequada
- Incubação sem tensão de CO<sub>2</sub>
- Incubação em temperatura inadequada
- Uso de antimicrobiano prévio
- Utilização de alça flambada não resfriada
- Tempo de incubação insuficiente
- Infecção crônica (infecção pouco ativa)
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado
- Agentes etiológicos exigentes com relação aos meios de cultura
- Necessidade de meios especiais para o crescimento de um agente infeccioso específico

- Os resultados falso-positivos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de assepsia inadequada
- Erro na conservação do material
- Tempo longo entre a coleta e análise
- Tempo excessivo de incubação
- Interpretação equivocada de colônias não patogênicas
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas
- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico

**9. CONTROLE DA QUALIDADE**

- *Materiais necessários*

Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection*) ou derivadas).

- *Controle de qualidade recomendado:*

Cepas	Resultado esperado
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 43069	Crescimento bom
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247	Crescimento bom
Meio não inoculado	Meio sólido opaco, com coloração marrom homogênea, livre de precipitados ou partículas visíveis.

- *Periodicidade*

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- *Análise dos resultados*

As cepas inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperados. Caso se constate algum problema ou diferença, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

- Este produto apresenta sensibilidade ≥ 95,9% e especificidade ≥ 99,5% frente aos principais microrganismos não fastidiosos.

Microrganismo	Sensibilidade % (Intervalo de confiança de 95%)	Especificidade % (Intervalo de confiança de 95%)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	108/116 <b>93.1%</b> (84.2 – 89.9%)	207/207 <b>100,0%</b> (99,8 – 100%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	83/92 <b>90.2%</b> (89,3 – 98.6%)	117/118 <b>99.2%</b> (98,1 – 100%)

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	138/143 <b>96.5%</b> (93,4 – 99,1%)	206/207 <b>99.5%</b> (96,3 – 100%)
---------------------------------	--	---------------------------------------

**10. GARANTIA DA QUALIDADE**

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário:

- que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;

- que os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;

- que os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br). Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail [sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br). Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

**11. REFERÊNCIAS**

1. Association of Official Analytical Chemists. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed., App. 3.08-3.09. AOAC International, Gaithersburg, MD.
2. Bisno, A.L. Acute pharyngitis. N Engl J Med, 344(3): 205–211, 2001.
3. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos na Experimentação Animal. 03 março 2000.
4. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Difco Manual, 2º ed., 2009.
6. Dunne Jr. W.M., Nolte, F.S. and Wilson, M.L. Blood Culture III. CUMITECH 1B. Coord. Ed. J.A. Hindler, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1997.
7. Eschenbach, D.A., Pollock, H.M. and Schachter, J. Laboratory diagnosis of female genital tract infection. CUMITECH 17. Coord. Ed. S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1983.
8. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, Clinical microbiology procedures handbook, vol.1, p. 1.6.1-1.6.7. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Koneman, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 6 ed., 2010.
10. Murray, P.R. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.
11. NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance. MMWR, 49, 8, March 3, 2000.
12. Russell FM *et al.* As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Agar Is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. Journal of Clinical Microbiology, 44: 3346–3351, set. 2006.
13. Reller, R.B., Murray, P.R. and MacLowry, J.D. Blood Culture II. CUMITECH 1A. Coord. Ed. J.A. Washington II, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1982.
14. Satzke C *et al.* Comparison of Citrated Human Blood, Citrated Sheep Blood, and Defibrinated Sheep Blood Mueller-Hinton Agar Preparations for Antimicrobial Susceptibility Testing of Streptococcus pneumoniae Isolates. Journal of Clinical Microbiology, 48: 3770-3772, out. 2010.
15. Schryver, A. and Meheus, A. Epidemiology of sexually transmitted diseases: a global picture. Bull WHO, 68:639–654, 1990.



**Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda**

CNPJ 76.619.113/0001-31  
Insc. Estadual 1370012926  
Rua Casimiro de Abreu, 521  
Pinhais/PR CEP 83.321-210  
Telefone 041 36619000  
[www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)

**Responsável Técnico:**

Daniela Fialho – CRF/PR-37492  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
SAC 0800-0410027  
[sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br)

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Europeia.
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando oxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso
	Controle		Controle negativo
	Controle positivo		Manter seco
	Manter afastado de luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho de IVD
	Não reutilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Segunda edição (28.07.2015)