

Método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos BrCAST-EUCAST

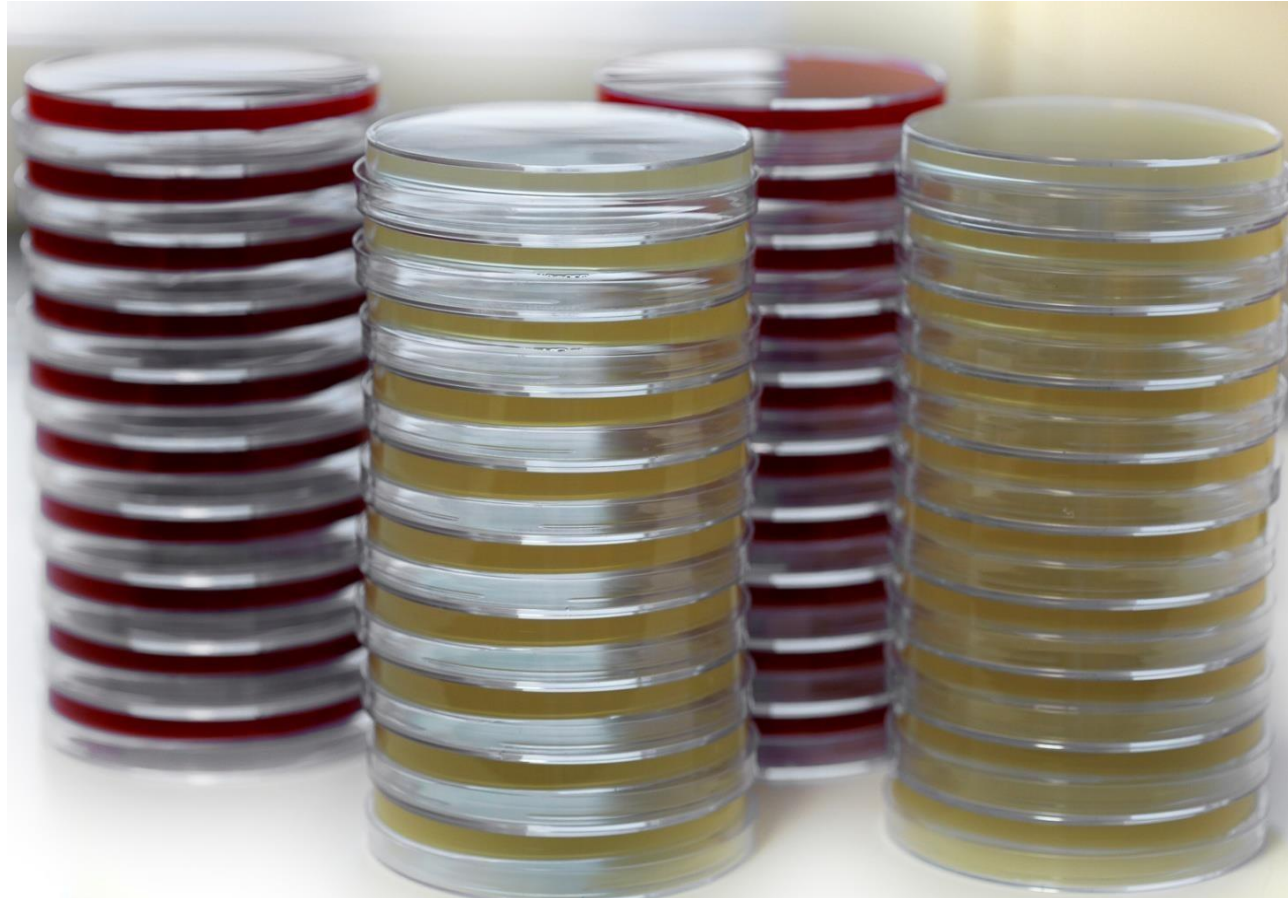
Versão 11.0 do EUCAST
Janeiro 2023

Versão para português válida a partir de 21/08/2023

Alterações em relação à versão anterior (v 10.0)

Slide	Alteração
39	Adicionado o esquema de subcultivo de cepas do CQ.

Meios para teste de sensibilidade



Versão 11.0, janeiro de 2023 do EUCAST. Versão para o português em 21/08/2023-<http://brcast.org.br>

Meios para teste de sensibilidade

- Ágar Mueller-Hinton (MH) não suplementado é utilizado para microrganismos não fastidiosos.
- Ágar MH com 5% de sangue de cavalo desfibrinado mecanicamente e 20 mg/L de β -NAD (MH-F, **M**ueller-**H**inton **F**astidiosos) é utilizado para microrganismos fastidiosos.
- Usar β -NAD com pureza de $\geq 98\%$.

Meios para microrganismos não-fastidiosos

Microrganismos	Meios
<i>Enterobacterales</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Vibrio</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Burkholderia pseudomallei</i>	Ágar Mueller-Hinton

Meios para microrganismos fastidiosos

Microrganismos	Meios
<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> dos grupos A, B, C e G <i>Streptococcus</i> do grupo viridans <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>coli</i> <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Aerococcus sanguinicola</i> e <i>urinae</i> <i>Kingella kingae</i>	Ágar Mueller-Hinton + 5% de sangue de cavalo mecanicamente desfibrinado + 20 mg/L de β -NAD (MH-F).

Preparação de meio de cultura no laboratório

- Preparar o meio de cultura de acordo com as instruções do fabricante.
- Para MH-F, não adicionar sangue ou β -NAD até que o meio atinja a temperatura de 42-45°C. Homogeneizar bem após os suplementos terem sido adicionados ao meio resfriado.
- Distribuir os meios nas placas sobre uma superfície nivelada para se obter uma profundidade uniforme de $4,0 \pm 0,5$ mm. Se a profundidade do meio estiver dentro da faixa aceitável, porém repetidamente acima ou abaixo de 4mm, ajustar o volume.
- Volume aproximado para placa circular de 90mm: 25mL; placa circular de 100mm: 31mL; placa circular de 150mm: 71mL; placa quadrada de 100mm: 40mL. As dimensões da placa podem diferir entre os fabricantes. Certifique-se de que o volume calculado está correto, com base nas dimensões reais da placa de Petri em uso.

Controle de Qualidade do Ágar Mueller-Hinton

- Testar cada novo lote de ágar MH para garantir que todos os halos de inibição estejam dentro dos intervalos de CQ do BrCAST/EUCAST.
- Problemas específicos:
 - Concentrações altas ou baixas de cátions divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}) no meio MH podem ser indicadas por halos de inibição de aminoglicosídeos com *P. aeruginosa* ATCC 27853 abaixo/acima dos limites de controle de qualidade, respectivamente.
 - O excesso de timina e timidina pode ser indicado por halos de inibição de sulfametoxazol-trimetoprima com *E. faecalis* ATCC 29212 abaixo dos limites de controle de qualidade.

Secagem e armazenamento de placas de ágar

- Placas preparadas no laboratório:
 - Armazenar em temperatura de 4-8°C
 - A secagem das placas, as condições de armazenamento e o prazo de validade devem ser definidos localmente.
- Placas adquiridas comercialmente :
 - Armazenar de acordo com as recomendações do fabricante.
 - Utilizar dentro do prazo de validade indicado.

Secagem e armazenamento das placas

- Certifique-se de que as placas de ágar estão em temperatura ambiente, antes da inoculação.
- A superfície do ágar deve estar seca antes do uso. O excesso de umidade no meio pode resultar em bordas mal definidas e/ou “névoa” dentro dos halos de inibição.
 - Nenhuma gota de água deve ser visível na superfície do ágar ou no interior da tampa. Isso geralmente é observado em placas armazenadas em sacos plásticos ou recipientes selados.
- Se necessário, secar as placas a 20-25°C *overnight* ou a 35°C, com a tampa removida, por 15min.
- Não secar excessivamente as placas.

Inóculo

- O método requer uma suspensão equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland*.

*Correspondendo aproximadamente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *E. coli*.



Selecionar colônias isoladas a partir de crescimento *overnight* em meio não seletivo



Preparação do Inóculo

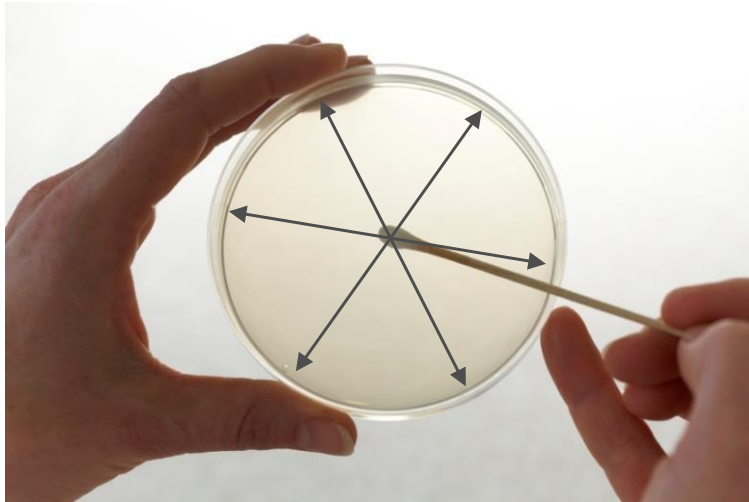
- Utilizar alça estéril ou *swab* de algodão para preparar a suspensão a partir de um crescimento *overnight* de um meio não seletivo. Se possível, selecionar várias colônias morfológicamente semelhantes para evitar a seleção de variantes atípicas.
- Suspende as colônias em salina e homogeneizar até obter uma suspensão uniforme.
- Ajustar o inóculo de modo a obter turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, adicionando salina ou mais bactérias. Preferencialmente, usar um dispositivo fotométrico para medir a turbidez.
 - Exceção: para *Streptococcus pneumoniae*, preparar a suspensão com densidade equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland a partir de crescimento em ágar sangue e ao padrão 1,0 da escala de McFarland a partir do crescimento em ágar chocolate.

Inoculação das placas

- Preferencialmente, utilizar a suspensão ajustada do inóculo em até 15 minutos após a preparação. A suspensão deve ser obrigatoriamente utilizada em até 60 minutos após a preparação.
- Garantir que as placas estejam em temperatura ambiente, previamente à inoculação.
- Mergulhar um *swab* de algodão estéril na suspensão.
- Para bactérias gram-negativas, remover o excesso de líquido pressionando e girando o *swab* contra a parte interna do tubo para evitar um inóculo muito denso.
- Para bactérias gram-positivas, não pressionar ou girar o *swab* contra a parte interna do tubo.

Inoculação das placas

- Espalhar o inóculo uniformemente sobre toda a superfície em três direções ou utilizar um rotador de placa.
- Para bactérias gram-positivas, tenha atenção especial a fim de garantir que não haja descontinuidade entre as estrias.
- Ao inocular várias placas de ágar com o mesmo inóculo, mergulhar o *swab* na suspensão para cada placa de ágar.



Armazenamento dos discos de antimicrobianos

- Armazenar os discos em estoque e em uso de acordo com as instruções do fabricante.
 - Alguns agentes são mais instáveis do que outros e podem ter recomendações específicas.
- Armazenar os discos em uso em recipientes selados com um dessecante indicador de umidade e protegidos da luz.
- Para evitar a condensação, deixar os discos atingirem a temperatura ambiente antes de abrir os recipientes.
 - É preferível manter os discos em temperatura ambiente durante o dia de uso do que submeter os discos repetidamente à variações de temperatura entre refrigeração e temperatura ambiente.
- Não usar discos fora da data de validade indicada pelo fabricante.

Aplicação dos discos de antimicrobianos

- Aplicar os discos em até 15 minutos após a inoculação.
- Os discos devem estar em contato uniforme e por completo na superfície do ágar.
- O número de discos em uma placa deve ser limitado para evitar a sobreposição de halos de inibição e interferência entre os agentes.
- É importante que os diâmetros dos halos possam ser medidos de forma confiável.



Incubação das placas

- Inverter as placas e verificar se os discos não se desprendem da superfície do ágar.
- Incubar as placas em até 15min após a aplicação dos discos.
- O empilhamento das placas na incubadora pode alterar os resultados devido ao aquecimento desigual entre elas. A eficiência das incubadoras varia, mas para a maioria das incubadoras, idealmente, empilhar no máximo cinco placas.
- Incubar as placas MH a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ em ar ambiente.
- Incubar as placas MH-F a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ com 4-6% de CO_2 (exceto para *Campylobacter*).

Incubação das placas

Microrganismos	Condições de incubação
<i>Enterobacterales</i>	35±1°C em aerobiose por 18±2h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35±1°C em aerobiose por 18±2h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±1°C em aerobiose por 18±2h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35±1°C em aerobiose por 18±2h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35±1°C em aerobiose por 18±2h
<i>Enterococcus</i> spp.	35±1°C em aerobiose por 18±2h (24h para glicopeptídeos)
<i>Aeromonas</i> spp.	35±1°C em aerobiose por 18±2h
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	35±1°C em aerobiose por 18±2h
<i>Bacillus</i> spp.	35±1°C em aerobiose por 18±2h
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	35±1°C em aerobiose por 18±2h

Incubação das placas

Microrganismos	Condições de Incubação
<i>Streptococcus</i> dos grupos A, B, C e G	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h
<i>Streptococcus</i> do grupo viridans	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h
<i>Haemophilus influenzae</i>	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h
<i>Pasteurella multocida</i>	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h
<i>Campylobacter jejuni</i> and <i>coli</i>	41±1°C em microaerofilia por 24h (40-48h)
<i>Corynebacterium</i> spp.	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h (40-44h)
<i>Aerococcus sanguinicola</i> e <i>urinae</i>	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h (40-44h)
<i>Kingella kingae</i>	35±1°C em aerobiose com 4-6% de CO ₂ por 18±2h (40-44h)
Outros microrganismos fastidiosos	Em definição

A regra dos 15-15-15 minutos

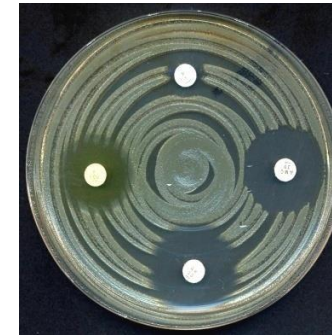
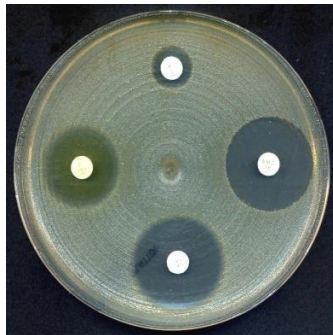
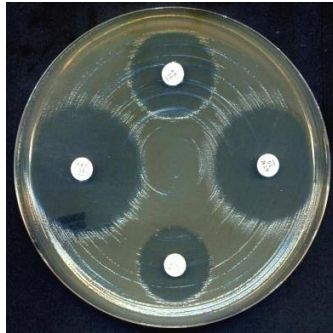
Seguir essas instruções para disco-difusão:

- Utilizar a suspensão, preferencialmente em até **15 minutos** da preparação, e obrigatoriamente em até 60 minutos.
- Aplicar os discos em até **15 minutos** após a inoculação.
- Incubar as placas em até **15 minutos** após a aplicação dos discos.

Leitura das placas após incubação

- Um inóculo correto e placas satisfatoriamente semeadas devem resultar em um crescimento confluyente.
- O crescimento deve ser distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar para obter halos de inibição circulares não distorcidos. Ver o próximo slide.
- Quando forem observadas colônias isoladas, o inóculo é muito escasso e o teste deve ser repetido.

O crescimento deve ser confluyente e uniformemente distribuídos na superfície do meio



As placas devem estar assim..

...e NÃO dessa forma

Leitura dos halos de inibição

- As bordas dos halos devem ser lidas no ponto de completa inibição de crescimento, visto a olho nu, com a placa posicionada a cerca de 30cm dos olhos.

Exemplos:



E. coli
Ciprofloxacino



S. aureus
Eritromicina



SCoN
Trimetoprima



S. pneumoniae
Rifampicina

Leitura do halos de Inibição

- Ler as placas de **MH** na parte posterior, contra um fundo escuro e sob luz refletida.
- Ler as placas **MH-F** com a tampa removida e sob luz refletida.



Leitura dos halos de Inibição

- Não utilizar luz transmitida (placas observadas contra a luz) ou lupa, exceto quando indicado.
- Segurar a placa em um ângulo de 45 graus em relação à bancada de trabalho pode facilitar a leitura, quando as bordas dos halos forem difíceis de definir.
- Aferir os diâmetros dos halos de inibição em milímetros com uma régua ou paquímetro calibrados.
- Se um leitor de halo automatizado for utilizado, ele deverá ser calibrado utilizando como referência a leitura manual.
- No caso de duplo halo de inibição ou colônias distintas dentro do halo, verificar a pureza e repetir o teste, se necessário. Se as culturas forem puras, as colônias dentro do halo de inibição devem ser consideradas.

Leitura dos halos de Inibição - exceções (1)

Microrganismo	Antimicrobiano	Leitura dos halos de inibição
<i>Enterobacterales</i>	Ampicilina Ampicilina-sulbactam Amoxicilina-ácido clavulânico	Ignorar o crescimento discreto que pode aparecer como um halo interno em alguns lotes de ágar MH.
<i>Enterobacterales</i>	Temocilina	Ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição.
<i>Enterobacterales</i>	Mecilinam	Ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição.
<i>E. coli</i>	Fosfomicina	Ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição e ler a borda externa.
<i>Proteus</i> spp.	Todos	Ignorar o <i>swarming</i> .
<i>S. maltophilia</i> , <i>A. xylosoxidans</i> e <i>B. pseudomallei</i>	Sulfametoxazol-trimetoprima	Ignorar o crescimento dentro do halo de inibição, se a borda de halo estiver bem definida, mesmo quando o crescimento no interior do halo for substancial.
<i>S. aureus</i>	Benzilpenicilina	Examinar a borda do halo de inibição com luz transmitida (placa posicionada contra a luz).

Leitura dos halos de Inibição - exceções (2)

Microrganismo	Agente Antimicrobiano	Leitura dos halos de inibição
<i>Staphylococcus</i> spp.	Cefoxitina	Examinar os halos de inibição cuidadosamente para detectar colônias dentro do halo.
<i>Enterococcus</i> spp.	Vancomicina	Examinar a borda do halo de inibição na parte frontal da placa com luz transmitida (placa posicionada contra a luz).
<i>Streptococcus</i> spp.	Qualquer antimicrobiano	Ler a inibição do crescimento e não a inibição ocasionada pela hemólise.
<i>H. influenzae</i>	Agentes betalactâmicos	Ler a borda mais externa do halo de inibição e desconsiderar o crescimento ao redor do disco.
<i>Aeromonas</i> spp.	Sulfametoxazol-trimetoprima	Ler o halo de inibição com bordas bem definidas e ignorar névoa ou crescimento discreto no interior do halo.
Qualquer microrganismo	Sulfametoxazol-trimetoprima Trimetoprima	Ignorar o crescimento tênue até o disco e medir a borda do halo mais nítida.

Interpretação dos halos de Inibição

- Verificar se os diâmetros dos halos de inibição para as cepas de controle de qualidade estão dentro de intervalos aceitáveis, antes de interpretar os testes.
- Interpretar os diâmetros dos halos de inibição em categorias de sensibilidade (S, I e R) de acordo com as tabelas de pontos de cortes do BrCAST-EUCAST atuais <http://brcast.org.br>.

Controle de qualidade do teste de sensibilidade

- Utilizar as cepas de controle de qualidade de rotina recomendadas para monitorar o desempenho do teste (consultar as tabelas de CQ disponíveis em <http://brcast.org.br>).
- Para o controle dos componentes inibidores nos discos combinados de β -lactâmicos, é recomendado utilizar cepas produtoras de β -lactamases específicas. Estas devem fazer parte da rotina do controle de qualidade. O componente ativo é avaliado com uma cepa sensível de CQ.
- Cepas de controle de qualidade com mecanismos de resistência definidos podem ser utilizadas para confirmar a capacidade de detectar resistência (CQ estendido, consultar as tabelas de CQ disponíveis em <http://brcast.org.br>).
- As cepas de controle de qualidade podem ser adquiridas em coleções de cultura ou em fontes comerciais.

Cepas de controle de qualidade de rotina BrCAST-EUCAST

Microrganismos	Números de coleção de cultura	Características
<i>E. coli</i>	ATCC 25922; NCTC 12241 CIP 76.24 DSM 1103; CCUG 17620; CECT 434	Sensível, tipo selvagem
<i>E. coli</i>	ATCC 35218; NCTC 11954 CIP 102181; DSM 5923; CCUG 30600; CECT 943	TEM-1, Produtor de β -lactamase
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603; NCTC 13368 CCUG 45421; CECT 7787	Produtor de ESBL (SHV-18)
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC BAA-2814	KPC-3, SHV-11 e TEM-1
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853; NCTC 12903 CIP 76.110; DSM 1117; CCUG 17619; CECT 108	Sensível, cepa selvagem
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213; NCTC 12973 CIP 103429; DSM 2569; CCUG 15915; CECT 794	Produtor de β -lactamase fraca
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212; NCTC 12697 CIP 103214; DSM 2570; CCUG 9997; CECT 795	Sensível, cepa selvagem

Cepas de controle de qualidade de rotina BrCAST-EUCAST

Microrganismos	Números de coleção de cultura	Características
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 49619; NCTC 12977 CIP 104340; DSM 11967 CCUG 33638	Sensibilidade reduzida à benzilpenicilina
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49766; NCTC 12975 CIP 103570; DSM 11970 CCUG 29539	Sensível, tipo selvagem
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560; NCTC 11351 CIP 70.2T; DSM 4688; CCUG 11284	Sensível, tipo selvagem

Cepas BrCAST-EUCAST para detecção de mecanismos de resistência específicos (CQ estendido)

Microrganismo	Números de coleção de cultura	Características
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603; NCTC 13368 CCUG 45421; CECT 7787	Produtor de ESBL (SHV-18)
<i>S. aureus</i>	NCTC 12493 CCUG 67181	<i>mecA</i> positivo, resistente à meticilina (MRSA)
<i>E. faecalis</i>	ATCC 51299; NCTC 13379 CIP 104676; DSM 12956 CCUG 34289	Resistente de alto nível a aminoglicosídeo (HLAR) e resistente à vancomicina (positivo para vanB)
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247; NCTC 12699 CIP 104604; DSM 9999 CCUG 26214	Sensibilidade reduzida a agentes β -lactâmicos devido a mutações PBP

Coleção de culturas

- ATCC** American Type Culture Collection, USA
<http://www.atcc.org>
- NCTC** National Collection of Type Cultures, Public Health England, UK
<https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc>
- CIP** Collection de l'Institut Pasteur, France
<https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collection-institut-pasteur-cip>
- DSM** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
<https://www.dsmz.de>
- CCUG** Culture Collection University of Gothenburg, Sweden
<http://www.ccug.se>
- CECT** Colección Española de Cultivos Tipo, Spain
<http://www.cect.org>

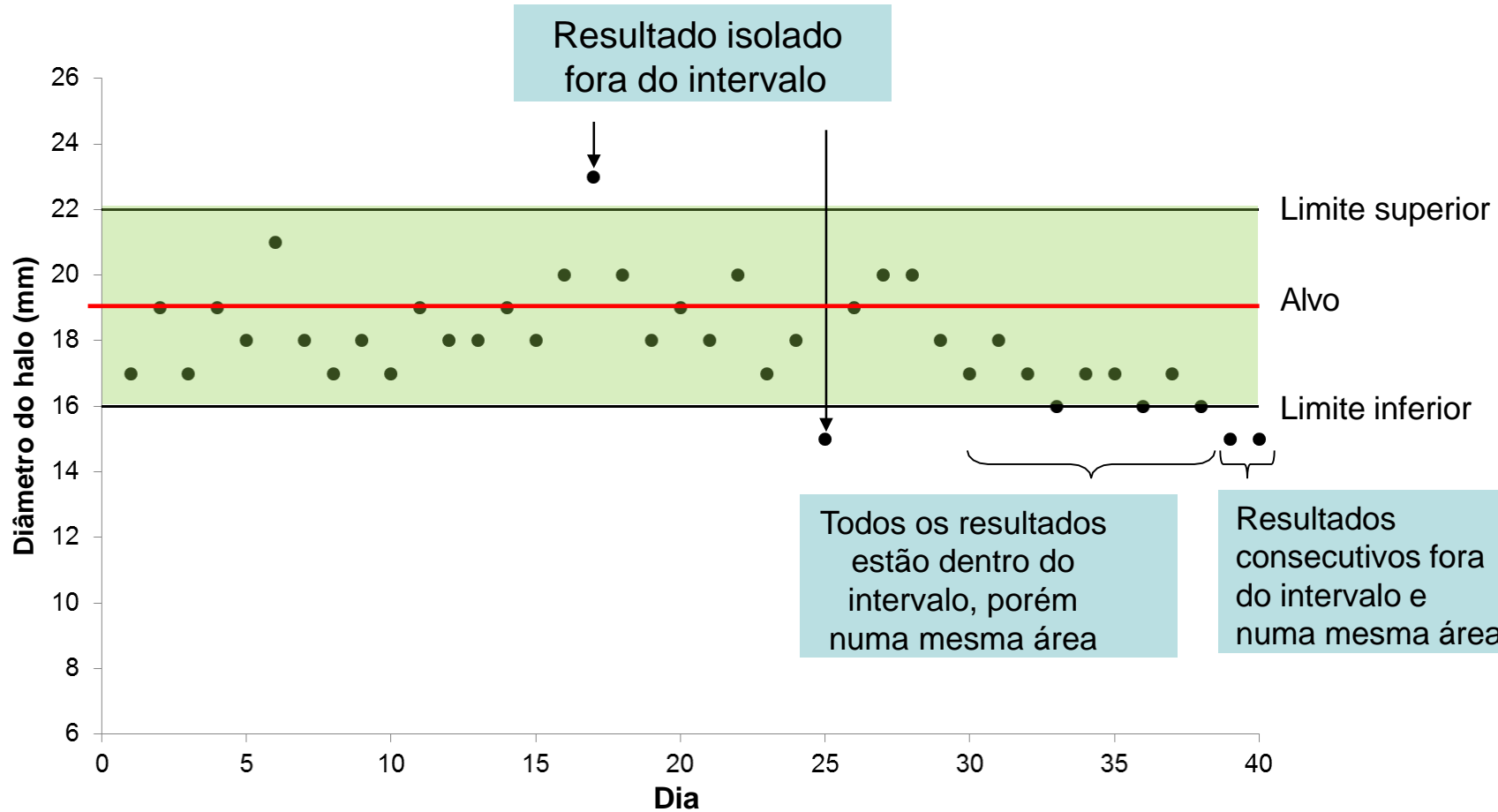
Utilização de cepas de controle de qualidade de rotina para avaliar o desempenho geral

- Idealmente, os controles de qualidade devem ser realizados e analisados diariamente ou, pelo menos, quatro vezes por semana para os agentes antimicrobianos que fazem parte da rotina.

Os testes dos controles devem ser realizados e validados, no mínimo, semanalmente para os antimicrobianos que fazem parte dos testes de rotina (consultar Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos BrCAST-EUCAST).

- Os testes de controle devem ser lidos e avaliados antes de relatar os resultados dos testes de sensibilidade para isolados de amostras clínicas.
- A cada dia em que os testes forem realizados, além de verificar o intervalo daquele resultado, verificar os resultados dos últimos 20 testes consecutivos.
- Verificar os resultados quanto à ocorrência de tendência e diâmetros de halos que estejam consistentemente acima ou abaixo do alvo.
- Se dois ou mais dos 20 testes estiverem fora da faixa, uma investigação será necessária.

Monitorando o desempenho do teste



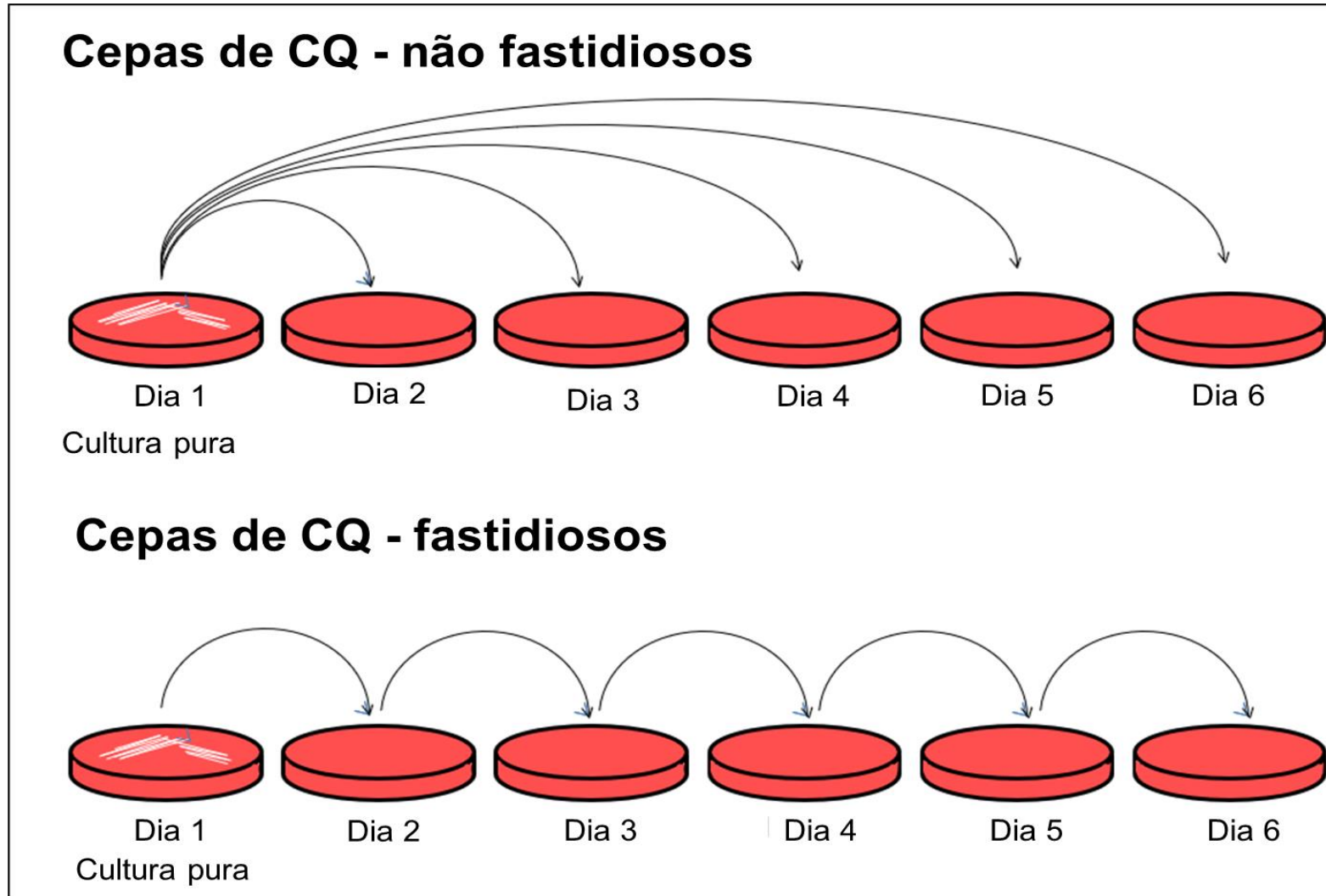
Resposta aos resultados de CQ fora do intervalo

- Se dois testes de CQ não consecutivos de 20 testes estiverem fora do intervalo aceitável, reportar os resultados do teste de sensibilidade e investigar.
- Se dois testes de CQ consecutivos de 20 testes estiverem fora do intervalo aceitável, investigar antes de relatar os resultados dos testes de sensibilidade. Repetir os testes dos pacientes, caso necessário.
- Se vários discos (>2) estiverem fora do intervalo aceitável em um dia, investigar antes de relatar os resultados do teste de sensibilidade. Repetir os testes, se necessário.
- Se a resistência em uma cepa de controle resistente não for reconhecida - então suprimir os resultados do teste de sensibilidade, investigar e testar novamente.

Armazenamento e subcultivo de cepas de controle

- Armazenar as cepas de controle em miçangas (opcional) a temperaturas inferiores ou igual a -70°C em caldo glicerol (ou equivalente comercial). Armazenar dois **ou mais frascos** de cada cepa, um para uso e outros para estoque **(consultar Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos BrCAST-EUCAST)**.
- Semanalmente, fazer um subcultivo do frasco em uso em meio não seletivo apropriado e verificar a pureza.
- Diariamente, preparar um subcultivo a partir de uma cultura pura. Utilizar várias colônias para evitar a seleção de mutante. Microrganismos fastidiosos só podem ser subcultivados de um dia para o outro **(para a opção de controles diários)**.
- As cepas de CQ podem ser subcultivadas por, no máximo, 6 dias. Em seguida, descartar as placas e preparar uma nova placa para uso, a partir do frasco em uso congelado. Verificar a pureza.
- Quando o frasco em uso estiver esgotado, fazer um subcultivo a partir do frasco estoque e preparar um outro frasco para uso.

Subcultivo de cepas de CQ para a opção de controle diário e/ou verificação/validação



Subcultivo de cepas CQ de bactérias não fastidiosas - Semanal



TUBO ESTOQUE
(Miçangas criotubo freezer)
Armazenar/reserva



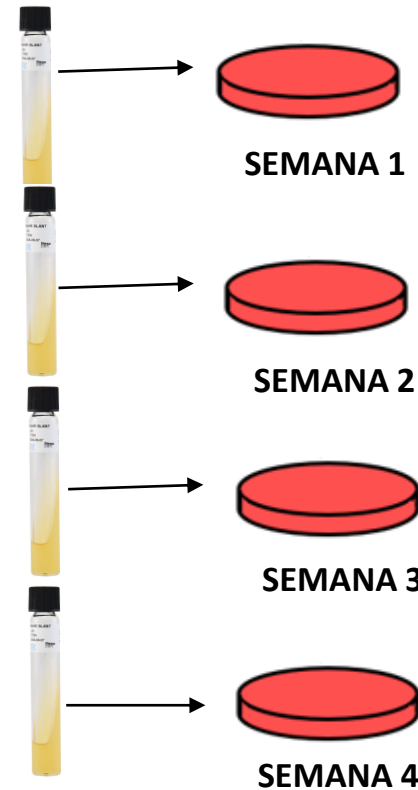
TUBO USO
(Miçangas criotubo freezer)

Opção em placa
(armazenar 2-8°C)



Opção em tubo
(armazenar 2-8°C)

Repique para uso



Fontes Potenciais de Erro (1)

Meios	Armazenamento das placas
	Não preparado de acordo com as instruções
	Variação de lote para lote ou mudança de fornecedor de ágar
	Suplementos (variações de lote para lote, quantidade incorreta ou prazo de validade expirado)
	pH
	Profundidade / volume do ágar
	Data de validade expirada
Condições do teste	Regra de "15-15-15 minutos" não foi seguida (suspensão utilizada em 15 minutos, discos aplicados em 15 minutos, incubação em 15 minutos)
	Incubação (temperatura, atmosfera e tempo)
	Inoculação incorreta (menos densa ou muito densa e irregular)
	Condições de leitura (fundo, iluminação)
	Leitura das bordas do halo de inibição

Fontes potenciais de erro (2)

Discos	Disco incorreto (agente errado ou concentração do disco errada)
	Potência do disco (armazenamento incorreto, agente instável, data de validade)
	Discos não estão na temperatura ambiente quando os recipientes são abertos
	Muitos discos na placa (interferência entre os agentes)
Microrganismos de controle	Cepa de CQ incorreta
	Mutação
	Contaminação
	Tempo de incubação da cultura

Site do BrCAST

- Verificar o site do BrCAST regularmente para atualizações sobre a metodologia, intervalos de CQ e de pontos de corte em <http://brcast.org.br/>
- Dúvidas e sugestões, acessar o site BrCAST em contato – fale conosco <http://brcast.org.br/contato>, e-mail contato@brcast.org.br.

