

and measure its productivity. **Materials and methods:** IA DNN –PC/GTX 1650 version 1.1.40 was configured in the automated metaphase image scanning equipment (Metafer), which uses the software for image analysis (Ikaros), all developed by Metasystems (Altussheim, Germany). Sixteen machine learning models (classifiers) were tested for bone marrow (oncohematological karyotype) and another 16 for peripheral blood (constitutional karyotype), eight of them with the function of chromosome segmentation in metaphase (separation) and 8 of them with the function of classify chromosomes (chromosomal pairing). 55 metaphases from routine studies of bone marrow for hematological malignancies [300-400 bands, 8 with numerical ($-Y$, -7) or structural ($20q-$) chromosomal alterations] and 65 metaphases from PHA-stimulated peripheral blood [550 bands, 7 cases with multiple overlapping chromosomes and 9 with numerical ($-X$, $+13$, $+21$) chromosomal alterations]. The time for manual and automated analysis (time for segmentation + classification + review) was compared. The chromosomal mispairing was noted. Productivity was evaluated (percentage difference in seconds manual-automated analysis/ manual analysis in seconds $\times 100$). **Results:** The average time for manual analysis of one metaphase in bone marrow samples was 74 ± 30 seconds (segmentation 34 seconds and classification 40 seconds) and in DNN it was 23 ± 19 seconds (segmentation 13 seconds, classification 10 seconds), with a gain of 51 ± 26 seconds and productivity gain of 68.6%, and mismatch of 1 ± 1.5 chromosomes. The average time for manual analysis of one metaphase in peripheral blood samples was 138 ± 56 seconds (segmentation 85 seconds and classification 52 seconds) and in DNN it was 29 ± 16 seconds (segmentation 15 seconds, classification 14 seconds), with a gain of 108 ± 49 seconds and productivity gain of 78.7%, and pairing error of 2.6 ± 2 . **Discussion:** AI allowed a significantly gain in productivity and TAT reduction in karyotype, the constitutional from 21 days to 15 days and the oncohematological karyotype from 14 days to 7 days (5 days for acute leukemias at diagnosis). **Conclusion:** The use of AI in karyotype analysis proved to be effective and efficient in our laboratory, even using a commercial image bank (DNN). There was an important gain in productivity and the possibility of reducing the TAT, adapting to international quality standards.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1510>

MAPEAMENTO DA MICROBIOTA HOSPITALAR PARA MONITORAMENTO DOS CASOS DE INFECÇÕES ADQUIRIDAS EM PERÍODO DE INTERNAÇÃO NA SANTA CASA DE OURINHOS

MM Constantino^a, IR Jardulli^b, LL Gatti^a,
DG Reginato^b, PMN Teixeira^b,
AF Vasconcelos^b, JCI Gazola^{a,b}

^a Centro Universitário, Faculdades Integradas de Ourinhos (UNIFIO), Ourinhos, SP, Brasil

^b Santa Casa de Ourinhos (SCO), Ourinhos, SP, Brasil

Introdução: O ambiente hospitalar é caracterizado pela presença de diversos tipos de microrganismos patogênicos e

oportunistas (bactérias, fungos e vírus), responsáveis por infecções nosocomiais. Em 2017, a Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM) estimou aproximadamente 700 mil mortes anualmente em todo o mundo decorrentes de bactérias multirresistentes que não respondem a antibioticoterapia. Várias organizações nacionais e internacionais de saúde reconheceram a importância e a urgência do estudo da resistência antimicrobiana e de bactérias multirresistentes, além do desenvolvimento de programas e estratégias hospitalares de vigilância para controlar suas consequências clínicas negativas, como execução de culturas microbiológicas de vigilâncias e a triagem de microrganismos multirresistentes em pacientes de risco para colonização, principalmente no setor de Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). **Objetivo:** Nesse sentido, o objetivo da pesquisa foi mapear a microbiota hospitalar existente nas UTIs da Santa Casa de Ourinhos, identificando a incidência dos microrganismos isolados. **Métodos:** Trata-se de um estudo experimental descritivo, com abordagem quantitativa. A amostragem foi constituída de 10 diferentes pontos ambientes da UTI, semeados em Ágar McConkey, Ágar Sangue e Ágar Sabouraud. **Resultados e discussão:** Todas as amostras semeadas em Ágar Sangue e Ágar Sabouraud, apresentaram crescimento microbiano. Já no Ágar McConkey, quatro amostras não apresentaram crescimento microbiano, enquanto as outras seis, sim. Foi possível identificar as espécies de bactérias *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, além de várias colônias de *Staphylococcus coagulase* negativa, leveduras e bolores. Os estafilococos, com ênfase *S. aureus*, estão entre os microrganismos mais importantes associados às infecções hospitalares, principalmente em UTIs. Por meio de toxinas próprias, esse patógeno ativa um mecanismo de invasão que facilita a ruptura de barreiras da epiderme. Além disso, utilizam de ferramentas biológicas para neutralizar a fagocitose e a resposta imune celular, dessa forma, obtém uma alta capacidade de colonização, o que pode representar um grave risco para pacientes que já se encontram imunodeprimidos. Os casos de infecções fúngicas em UTI, podem representar um alto risco para pacientes, sobretudo os casos de candidíase sistêmica, responsável por altos índices de óbitos em pacientes com infecções fúngicas sistêmicas. A candidíase sistêmica ocorre por consequência de um desequilíbrio do sistema imunológico do hospedeiro e pela exposição a fatores predisponentes, como uso de dispositivos médicos invasivos; uso prolongado de antibióticos de amplo espectro; tempo de permanência hospitalar e tratamentos invasivos indispensáveis ao paciente. Outras espécies de fungos também são capazes de causar múltiplos quadros clínicos em pacientes de UTI, no entanto, as espécies de *Candida* são responsáveis pela maioria desses casos (principalmente em pacientes imunossuprimidos). A *Candida albicans* é a espécie mais incidente relatada em infecções nosocomiais, porém, outras espécies do gênero *Candida* tiveram um aumento significativo nos últimos anos, incluindo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. **Conclusões:** A maioria dos pontos de coleta, originaram crescimento microbiano. Embora hospitalares e UTIs sejam reservatórios comuns de microrganismos, alguns desses patógenos podem oferecer riscos fatais para os pacientes e profissionais de saúde que ocupam esses espaços.

É necessário avaliar, de forma multidisciplinar, os resultados obtidos e traçar estratégias para o combate e eliminação desses patógenos, a fim de tornar a UTI um ambiente mais seguro e estável.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1511>

A NOVEL SYNTHETIC AND RECOMBINANT GLUCOCEREBROSIDASE FOR GAUCHER DISEASE: IN SILICO MOLECULAR EVOLUTION AND GENE THERAPY APPROACHES TO ENHANCE ENZYME ACTIVITY

LLS Figueiredo^a, LEB Souza^b, MD Orellana^b, DT Covas^{b,c}, F Lichtenstein^d, V Siciliano^e, KJ Abraham^{f,g}, R Weiss^h, SL Gersonⁱ, AM Fontes^a

^a Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Centro de Terapia Celular, Banco de Sangue de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Centro de Excelência em Descoberta de Novos Alvos, Instituto Butantã, São Paulo, Brazil

^e Center for Advanced Biomaterials for Healthcare, CRIB, Istituto Italiano di Tecnologia, Napoli, Italy

^f Departamento de Ciências da Computação, Instituto de Ciências Matemática e de Computação, São Carlos, SP, Brazil

^g Centro de Inteligência Artificial, C4AI, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^h Synthetic Biology Center, Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA

ⁱ School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, USA

Background: Gaucher disease (GD) is a rare lysosomal storage disease caused by pathogenic variants in the glucocerebrosidase gene (GBA1) resulting in a markedly decreased activity of the lysosomal enzyme b-glucocerebrosidase (GCase). Enzyme replacement therapy is the gold standard for treating GD patients. **Aim:** Here, we investigate whether *in silico* molecular evolution can be combined with synthetic biology and gene therapy for the development of a new recombinant enzyme with higher activity. **Materials and methods:** We developed novel GBA variants by introducing nonsynonymous mutations into the GBA gene obtained using *in silico* molecular evolution. These GBA variants are denoted as GBA-7, GBA-8, GBA-9 and GBA-12 and were cloned into lentiviral plasmids using synthetic biology approaches. Additionally, we obtained the wild-type GBA sequence from *Homo sapiens*, which is labeled GBA-Opt. In addition, we also aim to explore the differences in the transcriptional regulation using two

different promoters: the CMV and the human elongation factor 1A (hEF1A). As a control, we generated a construct that expresses the green fluorescent protein (GFP) gene under control of the same promoters. The characterization of these DNA constructs was performed using 293FT human cell line. We generated a total of 166 293FT cell lines with transient production of GBA (n = 100), GBA + GFP (n = 40), GFP (n = 8), and included virgin cells (n = 18). Out of the 100 GBA cell lines, 50 were utilized for real-time PCR analysis to investigate the transcription levels, while the remaining 50 were used to assess the enzyme-specific activity of GCase variants by fluorimetric assay. Furthermore, we determine mRNA secondary structures of GBA variants using the ViennaRNA and three-dimensional structures of the GCase-Opt and GCase-7 enzymes were elucidated using the AlphaFold2. **Results and discussion:** Quantitative real time PCR revealed that for 4 GBA transcripts (GBA-opt, GBA-7, GBA-9 and GBA-12) under control of hEF1A promoter showed higher expression in 293FT cells compared with CMV promoter (p < 0.05). Among the GBA variants, we observed that 293FT_GBA-7 cells express 5.2-fold higher transcript levels compared with 293FT_GBA-opt cells (p < 0.05). In cells lines co-transfected with GFP and GBA, we observed that comparing normalized activity values while considering transfection efficiencies can provide a more accurate assessment of the enzyme catalytic properties. We also screened the cell lysates for GCase specific activity. We observed that 293FT_GBA-7 cells and 293FT_GBA-Opt cells produced 507.6 ± 38.16 and 426.6 ± 25.25 nmol substrate hydrolyzed/mg protein/h, respectively. For the other transgenic 293FT cell lines these values were lower. Also, for 293FT transfected with mock plasmid this value was 82.92 ± 5.83 nmol/mg/h, respectively (p = 0.014). The 3D structures of GCase-Opt and GCase-7 revealed a high degree of alignment with the *Homo sapiens* enzyme (UniProt P04062). **Conclusions:** These findings demonstrate the promise of using *in silico* molecular evolution and synthetic biology approaches for developing enhanced enzyme variants for Gaucher disease, and suggest that GBA-7 could be a viable candidate for further investigation for replacement therapy in GD. Additional studies are warranted to investigate the biodistribution and long-term effects of GBA-7 in animal models.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1512>

PERFIL DOS PACIENTES COM ARTROPATIA HEMOFÍLICA GRAVE SUBMETIDOS À CIRURGIA ORTOPÉDICA DA HEMORREDE DO CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE SANTA CATARINA

RR Iop, JSS Ferreira-Filho, G Genovez, A Beretta, VKB Franco, JSF Donadel, CO Kurimori, AL Nunes, DT Oliveira

Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), Florianópolis, SC, Brasil

Objetivo: Descrever o perfil dos pacientes com artropatia hemofílica (AH) grave submetidos à cirurgia ortopédica na Hemorrede do Centro de Hematologia e Hemoterapia de