

Detección de biofilm en estafilococo coagulasa negativa y su relación con variables clínicas epidemiológicas

Leonor Aties Lopez¹, Yadmila Duret Gala², Milagros de la Caridad Milá Pascual³

1. Máster en Medios Diagnósticos. Licenciada en Tecnología de la Salud en Microbiología Clínica. Profesor Asistente. Facultad de Enfermería Tecnología. “Dr. Juan Manuel Páez Inchausti”. Universidad de Ciencias Médicas. Departamento de Medios Diagnósticos. Carretera del caney Km 2 ½. Santiago de Cuba. E-mail: latiesl@fts.scu.sld.cu.
2. Máster en Medios Diagnósticos. Licenciada en Tecnología de la Salud en Laboratorio Clínico. Profesor Asistente. Facultad de Enfermería Tecnología. “Dr. Juan Manuel Páez Inchausti”. Universidad de Ciencias Médicas. Departamento de Medios Diagnósticos. Carretera del caney Km 2 ½. Santiago de Cuba. E-mail: yduretq@fts.scu.sld.cu.
3. Máster en Enfermedades Infecciosas. Licenciada en Tecnología de la Salud Perfil Laboratorio Clínico. Profesor Asistente. Hospital Provincial Universitario “Dr. Ambrosio Grillo Portuondo”. Departamento de Microbiología. Santiago de Cuba. Carretera Camino Viejo del Cobre.

Resumen

Fundamento: La capacidad de algunas cepas de estafilococo coagulasa negativa para producir biofilm ha sido considerada por algunos autores como índice de virulencia y sirve para diferenciarlas de aquellas cepas contaminantes. **Objetivo:** Determinar la relación entre la producción de biofilm por cepas de estafilococo coagulasa negativa y variables clínicas epidemiológicas. **Material y métodos:** Se realizó un estudio observacional, analítico y transversal en cepas de estafilococo coagulasa negativa y la relación entre la producción de biofilm y variables clínico-epidemiológicas seleccionadas de los pacientes infectados, en el laboratorio de Microbiología del Hospital Provincial “Saturnino Lora” de Santiago de Cuba, en el periodo de enero – diciembre del 2012. Se comparó el método de mucus con el de agar rojo congo para la detección de biofilm bacteriano. **Resultados:** El grupo de edades donde más aislamientos hubo a

estafilococo coagulasa negativa, tanto en el sexo masculino como femenino fue el de 50-59 y 60 y más años. Respecto a las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas que presentaron los pacientes, se observó que el mayor número de personas afectadas fueron las que presentaron diabetes mellitus y nefropatías crónicas. La mayor cifra de aislamientos a estafilococo coagulasa negativa correspondió al servicio de nefrología. Los antimicrobianos que menor porcentaje de resistencia mostraron fueron la vancomicina, cloranfenicol novobiocina y doxiciclina. **Conclusiones:** La infección por estafilococo coagulasa negativa es frecuente en pacientes con edad avanzada, y la diabetes mellitus y nefropatías son factores a tener en cuenta. Finalmente se demostró que el medio agar rojo congo por su sencillez, alta sensibilidad y especificidad puede sumarse al arsenal diagnóstico de nuestros laboratorios para la detección de biofilm.

Palabras clave: estafilococo coagulasa negativa; biofilm; agar rojo congo.

Introducción

La importancia clínica actual del estafilococo coagulasa negativa está relacionada, desde que se descubrió, con el importante papel que juega en la ocurrencia de enfermedades infecciosas y a su capacidad de colonizar sitios específicos del hospedero.

El *slime* producido inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la fagocitosis, e inhibe la actividad de los glicopéptidos antimicrobianos como la vancomicina y teicoplanina; además acarrea efectos sobre la función inmunitaria, que interfiere en la activación y producción de linfoquinas o células T auxiliaadoras, las que son necesarias para la estimulación de otras células del sistema inmune; ocupando el estafilococo coagulasa negativa con frecuencia los primeros lugares en los patrones de circulación de gérmenes, relacionados con las infecciones del entorno hospitalario y el alto porcentaje de resistencia frente a los antimicrobianos.¹

La capacidad de algunas cepas de estafilococo coagulasa negativa para producir biofilm ha sido considerada por algunos autores como índice de virulencia y sirve para diferenciarla de las cepas contaminantes.^{1,2}

Por otro lado, la presencia de biofilm aumenta la capacidad de adherencia de los estafilococos coagulasa negativa e interfiere o modifica la actividad de antimicrobianos.

Esto último ha sido asociado a la falta de permeabilidad, a un secuestro del antimicrobiano en la complicada malla del biofilm en la que se organizan las bacterias al terminar el proceso de adherencia, y a la ausencia del microorganismo en la circulación al mantenerse suspendido en dicha estructura.³

Por todo lo expuesto, se llevó a cabo esta investigación para determinar la relación entre la producción de biofilm en cepas de estafilococo coagulasa negativa y variables clínicas epidemiológicas, así como comparar el método de mucus con el de agar rojo congo para la detección del biofilm bacteriano.

Material y métodos

Se realizó un estudio observacional, analítico y transversal en cepas de estafilococo coagulasa negativa y la relación entre la producción de biofilm y variables clínico-epidemiológicas seleccionadas de los pacientes infectados, en el laboratorio de Microbiología del Hospital Provincial “Saturnino Lora” de Santiago de Cuba, en el periodo de enero – diciembre del 2012.

El universo de estudio estuvo constituido por 107 cepas de estafilococo coagulasa negativa que crecieron de muestras de catéter y hemocultivos de pacientes ingresados en las salas de Cuidados Intensivos, Cardiología, Nefrología y el Centro de Cirugía Cardiovascular, en el periodo estudiado, a las cuales se le aplicaron los métodos diagnósticos: prueba para la producción de mucus y agar rojo congo.

Se validaron los resultados de ambas pruebas en términos de sensibilidad y especificidad, mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{b}{b + d}$$

Donde a): corresponde a los verdaderos positivos; b) a los falsos positivos; c) a los falsos negativos y d) a los verdaderos negativos.

Para lo cual se consideraron:

Verdaderos positivos: producen biofilm y la prueba fue positiva.

Falsos positivos: no producen biofilm y la prueba fue positiva.

Verdaderos negativos: no producen biofilm y la prueba fue negativa.

Falsos negativos: producen biofilm y la prueba fue negativa.

Con la información recopilada se confeccionó en una base de datos mediante el sistema SPSS versión 13,0 para Windows, que permitió realizar todo el procesamiento estadístico para lo que se utilizó el sistema estadístico *odd ratio diagnóstica* (DOR).

Ello permitió obtener las distribuciones de frecuencias y confeccionar las tablas, se hizo un análisis sintético, inductivo y deductivo de cada tabla; partiendo de la bibliografía revisada se establecieron comparaciones con estudios nacionales y foráneos, lo cual permitió formular conclusiones.

Resultados

La tabla 1 refleja los grupos de edades donde más aislamientos positivos hubo a estafilococo coagulasa negativa; tanto en el sexo masculino como femenino, fueron los de 50-59 y el de 60 y más años.

Tabla 1. Distribución de las muestras de cepas de estafilococo coagulasa negativa según edad y sexo. Hospital Provincial Docente “Saturnino Lora”. Santiago de Cuba. 2012.

Sexo					
Edad (años)	Masculino		Femenino		Total
	No	%	No	%	
20-39	1	2,1	3	5	4
40-49	1	2,1	1	1,6	2
50-59	11	23,4	7	11,6	18
60 y más	34	72,3	49	81,6	83
Total	47	100	60	100	107

Fuente: Base de datos.

Con respecto a las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas que presentaron los pacientes cuyas muestras se estudiaron según grupos de edades, se observó que el mayor número de personas afectadas fueron las que presentaron diabetes mellitus y nefropatías crónicas, correspondiendo al grupo de edades de 60 y más años, con 44 y 34 pacientes, respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Enfermedades crónicas no transmisibles asociadas, según grupos de edades.

Edad	Enfermedades crónicas no transmisibles			Total	
	Diabetes	Insuficiencia renal crónica	Enfermedades del corazón	No	%
20-39	1	2	1	4	3,7
40-49	1	1	-	2	1,8
50-59	9	7	2	18	16,8
60 y más	44	34	5	83	77,5
Total	45	54	8	107	100

Fuente: Base de datos.

El mayor número de aislamientos a estafilococo coagulasa negativa (tabla 3) correspondió al servicio de nefrología, tanto en muestras de catéter con 25 como en hemocultivos con 31; seguido de la unidad de cuidados intensivos con 13 y 11 respectivamente; cardiología, 3 y 9 y el centro de cirugía cardiovascular, 11 y 4.

Tabla 3. Total de aislamientos de cepas de estafilococo coagulasa negativa en catéter, hemocultivos por servicios hospitalarios de procedencia.

Servicios	Hemocultivos		Catéter		Total
	No	%	No	%	
Nefrología	31	56,3	23	48	54
Unidad de cuidados intensivos	11	20	13	25	24
Cardiocentro	4	7,2	12	21,1	15
Cardiología	9	16,3	4	5,7	14
Total	55	100	52	100	107

Fuente: Base de datos.

Con respecto a los procedimientos diagnósticos empleados, se realizó la comparación entre el agar rojo congo y la prueba de mucus, ésta última utilizada como *gold standard* o patrón de oro; la misma reveló la sensibilidad y especificidad del método agar rojo congo las cuales estuvieron en 93,4 y 100 %, respectivamente (tabla 4).

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad del agar rojo congo para detectar la producción de biofilm por el estafilococo coagulasa negativa.

Estafilococo coagulasa negativa	Prueba de Mucus			
	Positivo	Negativo	Total	%
Prueba Agar rojo Congo				
Positivo	100	7	107	93,4
Negativo	7	98	107	6,5
Total	107	107	214	100

Fuente: Base de datos.

Sensibilidad - 93,4 % Especificidad – 100 %

Entre los gérmenes asociados a estafilococo coagulasa negativa en muestras de catéter y hemocultivos se aisló *klebsiella spp*, *acinetobacter spp*, *escherichia coli*, *estreptococo a hemolítica* y *enetrobacter spp*.

En relación con la resistencia del estafilococo coagulasa negativa frente a los antimicrobianos utilizados en el laboratorio para las pruebas de antibiograma *in vitro*, se observó que los antimicrobianos que menor porcentaje de resistencia mostraron fueron la vancomicina, cloranfenicol novobiocina y doxiciclina.

Discusión

La adherencia bacteriana constituye el paso previo al desarrollo de una infección. Ésta en sus primeros estadios está mediada por interacciones físicoquímicas, destacándose entre ellas las interacciones hidrofóbicas.

En 1972, Bayston y Penny³ observaron la producción de una sustancia de naturaleza mucoide por algunas cepas de *Staphylococcus epidermidis*, causantes de infecciones en pacientes con derivaciones de líquido ceforraquídeo. Más tarde, en estudios posteriores se observó que los catéteres infectados por este microorganismo estaban recubiertos por un material denso, mucoide, en el que se encontraban suspendidas las bacterias. Dicho material se conoció con el nombre de "slime" (limo), que es una sustancia de naturaleza polisacárida que aún no es perfectamente conocida.

La capacidad de algunas cepas de estafilococo coagulasa negativa para producir slime ha sido considerada por algunos autores como índice de virulencia y sirve para diferenciarla de aquellas cepas contaminantes.¹

Este estudio reflejó que el mayor número de aislamientos a estafilococo coagulasa negativa se comportó igual para ambos sexos en el mismo grupo de edades, lo cual coincide con lo planteado en las bibliografías internacionales.^{4,5}

Estos estudios expresan que estas edades representan un factor de riesgo debido a que aparecen en las mismas enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes e insuficiencia renal, por lo que están frecuentemente más predispuestos a adquirir infecciones relacionadas con el entorno hospitalario ya que su sistema inmune es deficiente y porque una vez hospitalizados son usualmente manipulados con técnicas invasivas como la implantación de catéter, eventos quirúrgicos agresivos y el uso y abuso de la terapéutica.^{4,5}

Con respecto a las enfermedades crónicas no trasmisibles asociadas que presentaron los pacientes cuyas muestras se estudiaron según grupos de edades, asumimos lo planteado por Planet et al,⁶ Atshan et al,⁷ quienes expresan que estas dolencias, diabetes mellitus y nefropatías, prevalecen más en estas edades y que el número de personas tiende a aumentar debido al envejecimiento de la población, factores socioeconómicos y antecedentes familiares.

En cuanto a las nefropatías se observa que en el grupo etéreo donde más prevalencia hubo fue igualmente en el de 60 y más años, puesto que a partir de la cuarta década de la vida se produce un decrecimiento del filtrado glomerular que en la mayoría de los ancianos disminuye la masa renal y se observa un porcentaje más alto de glomérulos esclerosados en relación directa con el paso de los años a lo que se podría sumar la presencia de enfermedades que por sí solas son capaces de dañar las estructuras funcionales del riñón, lo que se corrobora con la bibliografía explorada.⁸

Según grupo de edades en las enfermedades del corazón los grupos etéreos que más prevalecieron fue el de 50-59 y 60 y más años, lo que concuerda con las bibliografías consultadas^{9,10} cuando expresan que se produce un incremento de su frecuencia a medida que aumenta la edad, considerando estas enfermedades como factor de riesgo de éstos ya que son más propensos a contraer enfermedades infecciosas relacionadas con el entorno hospitalario, considerando estas enfermedades como factor de riesgo ya que son más propensos a contraer enfermedades infecciosas relacionadas con el entorno hospitalario.

En relación a los gérmenes asociados asumimos lo planteado por Atshan et al,⁷ quienes opinan que estas infecciones pueden ser polimicrobianas, que los gérmenes asociados a estafilococo coagulasa negativa en muestras de catéter y hemocultivos son los gramnegativos y bacilos no fermentadores como la *Escherichia coli* y bacilos no fermentadores como el *Acinetobacter spp*; a pesar que la bibliografía consultada plantea que la *Klebsiella spp* es raramente causa de sepsis relacionada con el catéter. Sin embargo, en nuestro estudio fue el microorganismo que más aislamientos aportó asociado al estafilococo, siendo estos responsables de bacteriemia secundaria relacionada con el uso de éste dispositivo, infección cada vez más prevalente en el entorno hospitalario, ganando en los últimos años protagonismo como causa de infección relacionada con el entorno hospitalario.¹¹⁻¹³

Los agentes comprometidos en la infección por el uso de catéter están relacionados con el tiempo de utilización del catéter, la virulencia del microorganismo infectante, la antibioterapia situación basal del enfermo entre otras; a pesar que el uso de estos dispositivos ha sido de gran utilidad clínica ya que permiten un acceso rápido y seguro al torrente sanguíneo, pudiendo ser utilizados para la administración de fluidos endovenosos, medicamentos, productos sanguíneos, nutrición parenteral total, monitoreo del estado hemodinámico y para hemodiálisis, no están exentos de riesgos habiéndose descrito complicaciones mecánicas e infecciosas.¹¹⁻¹³

La infección relacionada a catéteres constituye una de las principales complicaciones de su uso y la primera causa de bacteriemia nosocomial primaria.¹¹⁻¹³

Con respecto a la relación entre los servicios de procedencia de las muestras y el número de aislamientos, se corresponde con las bibliografías internacionales exploradas,^{8,9} cuando plantean la alta incidencia de este microorganismo, ya que la patogenia de la infección relacionada con catéter es multifactorial y compleja, involucrando en la infección relacionada con catéteres de larga duración la colonización endoluminal y los gérmenes Grampositivos como los *staphylococcus aureus* y los estafilococos coagulasa negativa son los más frecuentemente aislados en estos servicios.¹⁰⁻¹⁵

Con relación a la resistencia de estafilococo coagulasa negativa frente a los antimicrobianos utilizados en el laboratorio se observó, que el cloranfenicol,

vancomicina, novobiocina y doxyciclina fueron los más eficaces para combatir la infección provocada por esta entidad, a pesar que la bibliografía consultada plantea que la vancomicina no es efectiva ya que ésta es una molécula muy grande incapaz de penetrar la intrincada red que forma el biofilm por lo que es necesario administrarle altas dosis al enfermo para eliminar la misma.¹⁶⁻¹⁸

Con respecto a la fosfomicina la bibliografía explorada³ plantea la eficacia de éste para eliminar las sepsis producida por estafilococo coagulasa negativa. Sin embargo, la investigación demostró la incapacidad del mismo ya que se observó un alto porcentaje de resistencia.

Es criterio de los autores señalar que el alto porcentaje de resistencia frente a los antimicrobianos, no solo se debe al exopolisacárido producido por estafilococo coagulasa negativa, sino que también puede estar relacionado con la hospitalización prolongada, así como por el uso y abuso de los antimicrobianos, lo cual ha traído como consecuencia la aparición de gérmenes resistentes con el consiguiente fracaso de los tratamientos.

Con relación a la efectividad de la técnica de mucus, es inferior a la de agar rojo congo; ello se explica porque depende de la persona que realiza el diagnóstico, de condiciones ambientales adecuadas y de que la cristalería para la realización del diagnóstico se encuentre en óptimas condiciones de limpieza.

Referente a la utilidad de la técnica del agar rojo congo, es fácil constatar como se desprende del análisis realizado de la tabla 4 y del hecho de que no depende de la experiencia y habilidad de la persona para interpretarla. A ello podemos añadir su mayor reproducibilidad, pues según García,¹¹ Pascual et al,¹² y Chao et al¹³ las colonias mantienen su viabilidad, a diferencia de la prueba de mucus donde las colonias mueren después de agregar la safranina al 2 %.

La concentración del indicador rojo congo tiene también una influencia manifiesta en el cambio de tonalidad y se observó que a mayor concentración del mismo se evidencia mejor el cambio de color hacia el negro; se presume que debido a la presencia de compuestos ácidos y a la disminución consiguiente del pH que provoca el biofilm, las colonias que no producen el mismo se mantienen de color rosa porque el pH del medio se mantiene básico independientemente de que las bacterias utilicen la sacarosa en su

metabolismo. Esta hipótesis debe comprobarse con otras investigaciones dirigidas específicamente a este objetivo.

Conclusiones

- Las infecciones por el estafilococo coagulasa negativo son frecuentes en ancianos portadores de enfermedades crónicas no transmisibles.
- El procedimiento diagnóstico Agar Rojo Congo es una herramienta de trabajo de gran valor para la determinación del biofilm producido por este germen, por su alta sensibilidad y especificidad.

Referencias bibliográficas

1. Grzebyk M, Brzychczy- WM, Piotrowska A, Krzyściak P, Heczko PB, Bulanda M. Phenotypic evaluation of hydrophobicity and the ability to produce biofilm in coagulase-negative staphylococci isolated from infected very-low- birthweight newborns. *Med Dosw Mikrobiol.* 2013; 65 (3):149-59. Polish. PubMed PMID: 24432554. [citado 10 de diciembre 2013] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
2. Blackledge MS, Worthington RJ, Melander C. Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol.* 2013 Jul 18. doi: pii: S1471-4892(13)00141-0. 10.1016/j.coph.2013.07.004. [Epub ahead of print] Pub Med PMID: 23871261. [citado 5 de agosto 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
3. França A, Carvalhais V, Maira-Litrán T, Vilanova M, Cerca N, Pier G. Alterations in the *Staphylococcus epidermidis* biofilm transcriptome following interaction with whole human blood. *Pathog Dis.* 2014 Jan 3. doi: 10.1111/2049-632X.12130. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24391077. [citado enero, 16 2014] Disponible en:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
4. Rivera Castrillón LE, Ramos Palma A, Desgarenes Padilla MC. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Rev Mex. Dermatología.* [Internet] 2010 [citado 2 de mayo 2013]; 54(1): 14-24. Disponible en: <http://www.medigraphic.com>

5. Silva Ferrera J, Rizo Rodríguez R, Castañeda Márquez V, Hing León JR. Prevalencia y causas de la insuficiencia renal crónica en 2 áreas de salud de Santiago de Cuba [Internet]. MEDISAN. 2013 [citado agosto 15, 2013]; 12(2): [aprox. 10 p.]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol12_2_08/san01208.htm.
6. Planet PJ, Larussa SJ, Dana A, Smith H, Xu A, Ryan C et al. Emergence of the Epidemic Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strain USA300 Coincides with Horizontal Transfer of the Arginine Catabolic Mobile Element and speG-mediated Adaptations for Survival on Skin. MBio. 2013 Dec 17; 4(6).
7. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:417247.
8. Haniagua Contreras G, Monroy Pérez E, Gutiérrez Lucas R, Sainz Espuñes T, Bustos Martínez J, Vaca S. Genotypic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from the anterior nares and catheter of ambulatory hemodialysis patients in Mexico. Folia Microbiol (Praha). 2014 Jan 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24424465. [citado enero, 19 2014]. Disponible en: <http://www.web.ebscohost.com>.
9. Babra C, Tiwari J, Costantino P, Sunagar R, Isloor S, Hegde Net al. Human methicillin-sensitive Staphylococcus aureus biofilms: potential associations with antibiotic resistance persistence and surface polysaccharide antigens. J Basic Microbiol. 2013 May 17. doi: 10.1002/jobm.201200557. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23686411. [citado enero 12, 2013]. Disponible en: <http://www.web.ebscohost.com>.
10. Guembe Ramírez M. Diagnóstico Microbiológico de la Infección relacionada con el Catéter [tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense; 2010 [consultado 20 de enero 2012]. Disponible en: <http://www.eprints.ucm.es>
11. García Loboguerrero F. Infecciones asociadas a catéteres venosos centrales en la unidad de cuidado intensivo pediátrico. Rev CES Med. [Internet]. 2008 [Consultado 5 febrero 2012]; 22(2):77-84. Disponible en: <http://www.ces.edu.co>.

12. Pascual A, Cercenado E, Salavert M, García Sánchez JE, Eiros JM, Liñares J, et al. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clin. [Internet]. 2011 [citado 10 de febrero 2012]; 29(4): 16-21. Disponible en: <http://www.elsevier.es>
13. Cha JO, Yoo JI, Yoo JS, Chung HS, Park SH, Kim HS et al. Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health Res Perspect*. 2013 Oct; 4(5):225-32.
14. Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H et al The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infect Dis*, 2013 May 8; 13:210.
15. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl* 2013; 136:1-51. doi: 10.1111/apm.12099. PubMed PMID: 23635385. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23635385>.
16. Simojoki H, Hyvönen P, Plumed Ferrer C, Taponen S, Pyörälä S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet Microbiol*. 2012 Aug 17; 158(3-4):344-52. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.031. Epub 2012 Feb 28. PubMed PMID: 22424866. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424866>.
17. Subramanian P, Shanmugam N, Sivaraman U, Kumar S, Selvaraj S. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterized patients in Pondicherry, India. *Australas Med J*. 2012;5(7):344-8. doi: 10.4066/AMJ.2012.1193. Epub 2012 Jul 31. PubMed PMID: 22905060; PubMed Central PMCID: PMC3412999. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22905060>.
18. John S. Prevalence and pattern of psychiatric morbidity and health related quality of life in patients with ischemic heart disease in a tertiary care hospital. *Indian J Psychiatry*. 2013 Oct; 55(4):353-9. doi: 10.4103/0019-5545.120554. PubMed PMID: 24459306. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24459306>.