

Studi Diagnostik Menggunakan PCR untuk Mendeteksi Virus Hepatitis C Dalam Cairan Air Mata Pasien Hemodialisis

Petty Purwanita*, Novia Natsir

Departemen Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia
E-mail: pettypurwanita@yahoo.com

Abstrak

Virus hepatitis C (HCV) adalah virus hepatotropik dan limfotropik. Pasien yang terinfeksi HCV setidaknya terdapat satu manifestasi ekstrahepatik okular dan di kantung lakrimal selama perjalanan penyakit mereka. Penularan HCV terjadi melalui paparan darah yang terkontaminasi dengan faktor risiko tinggi pada pasien hemodialisis sekitar 70%. Deteksi RNA HCV lebih sensitif dan spesifik dengan PCR (Reaksi Polymerase Chain). Studi ini mengevaluasi sensitivitas dan spesifisitas virus hepatitis C PCR pada pasien hemodialisis air mata di Mohammad Hoesin Palembang. Dengan menggunakan studi diagnostik observasional dari 25 sampel dari air mata dan darah pada pasien hemodialisis. PCR diperiksa oleh RT-PCR. Data yang diperoleh dianalisis dengan tes diagnostik. Didapatkan hasil dari 25 sampel HCV-RNA terdeteksi oleh PCR dalam air mata 11 kasus positif (44%) dan 20 kasus positif (80%) dalam plasma. Nilai sensitivitas air mata adalah 72,73% dan spesifisitasnya 13,33%. Spesimen air mata cukup sensitif tetapi tidak spesifik, oleh karena itu pemeriksaan PCR dapat digunakan untuk skrining virus hepatitis C pada pasien hemodialisis.

Kata kunci: Air Mata, Hemodialisis, Reaksi Rantai Polimerase, Virus Hepatitis C (HCV)

Abstract

Diagnostic Study Using PCR to Detect Hepatitis C Virus in Tears Fluid of Hemodialysis. Patients Hepatitis C virus (HCV) is a hepatotropic and lymphotropic virus. Patients infected with HCV might develop at least one extrahepatic manifestation ocular and in the lacrimal sac during the course of their disease. HCV transmission occurs through exposure to blood contaminated with high risk factor in hemodialysis patients about 70%. Detection RNA HCV more sensitive and specific by PCR (Polymerase Chain Reaction). This study evaluated the sensitivity and specificity of PCR hepatitis c virus in tears hemodialysis patients at Mohammad Hoesin Palembang. This is an observational diagnostic study of 25 samples from tears and blood in hemodialysis patients. PCR examined by RT-PCR. The data obtained were analyzed by a diagnostic test. Of 25 samples HCV-RNA was detected by PCR in the tears 11 cases were positive (44%) and 20 cases were found positive (80%) in plasma. The value of the sensitivity of the tears is 72.73% and the specificity was 13.33%. Tears fluid specimen quite sensitive but not specific, therefore PCR examination can be used for screening for hepatitis C virus in hemodialysis patients.

Keywords: Tears, Hemodialysis, Polymerase Chain Reaction, Hepatitis C Virus (HCV)

1. Pendahuluan

Virus Hepatitis merupakan masalah kesehatan yang secara umum dapat menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang signifikan diseluruh dunia.¹ Menurut data WHO tahun 1999 kira-kira sekitar 170 juta orang di dunia terinfeksi hepatitis C atau 3% dari populasi dunia dan secara kronis beresiko berkembang menjadi sirosis hati dan atau

kanker hati. Data di Indonesia menunjukkan tingkat prevalensi hepatitis C berkisar antara 0,5%-3,4% atau sekitar 1–7 juta penduduk Indonesia mengidap infeksi virus C. Virus hepatitis C (HCV) paling berbahaya dibandingkan dengan virus hepatitis lainnya, karena 70%-90% penderita yang terinfeksi akan menjadi infeksi yang menahun dan berkembang menjadi hepatitis kronik

kemudian sirosis hati, kanker hati dan kematian. HCV adalah virus RNA yang digolongkan dalam klasifikasi *Flaviviridae*, genus *hepacivirus* yang merupakan virus RNA rantai tunggal. Patogenesis dimulai sejak virus hepatitis C masuk ke dalam darah dan terus beredar di dalam darah menuju hati, menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel, lalu berkembang biak (terjadi proses replikasi virus), hati menjadi meradang dan sel hati mengalami kerusakan, terjadilah gangguan fungsi hati. HCV merupakan virus *hepatotropic* dan sekaligus virus *lymphotropic*. Virus hepatitis C ini sering menimbulkan komplikasi ekstra hepatic yang salah satunya dapat ditemukan di mata, seperti *keratokonjungtivitis sicca*, sindrom mata kering, ulkus mooren, dan retinopati. Transmisi HCV terjadi terutama melalui paparan darah yang tercemar virus, dengan insiden terbanyak pada pengguna narkoba suntik sekitar > 80%, pada penderita dengan riwayat transfusi dan hemodialisis sekitar 70%.

Penularan dapat juga terjadi melalui transmisi seksual, maternal-neonatal dan kelahiran dari ibu yang terinfeksi walaupun efisiensi dan frekuensinya rendah. Transmisi virus hepatitis C selain melalui darah, dapat juga melalui cairan tubuh seperti air mata. Air mata memainkan peranan penting sebagai proteksi/ pelindung mata. Cairan air mata mempunyai komposisi yang unik, dengan beberapa komponen yang secara signifikan berbeda dengan komposisi dari plasma darah. Tidak hanya berbeda dari beberapa jumlah variasi di komponennya, tetapi terdapat suatu substansi yang hanya ada di air mata dan tidak ada di plasma darah, seperti lisozim dan *tear specific pre-albumin (lipocalin)*. Analisis kimia dari air mata menunjukkan bahwa konsentrasi garam didalamnya mirip dengan komposisi di dalam plasma darah.² Pada air mata konsentrasi K⁺, Na⁺, Cl⁻ memiliki konsentrasi lebih tinggi dibandingkan dari plasma darah, dan laktoferin, fosfolipase A₂, serta tumor

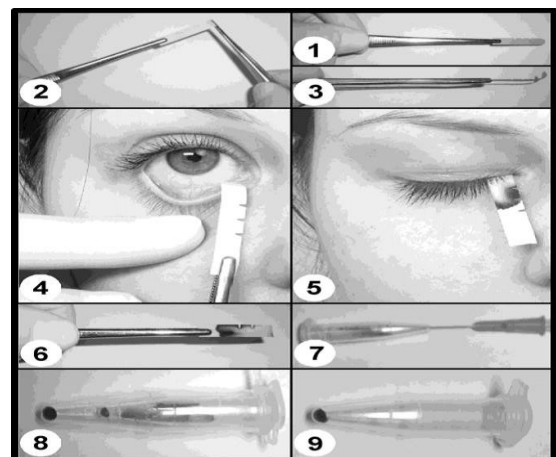
nekrosis factor- α lebih tinggi pada air mata.¹ Sedangkan albumin dan transferin lebih tinggi pada plasma. Pada kelenjar lakrimal normal juga mengandung sel plasma dan limfosit T, serta beberapa sel dendrit, sel B, dan makrofag. Virus hepatitis C juga terdapat pada air mata. Beberapa studi penelitian juga menunjukkan kemungkinan transmisi melalui air mata yang terkontaminasi virus hepatitis C tersebut. Deteksi yang biasa dilakukan untuk mengetahui adanya infeksi virus adalah dengan penanda serologi. Pada hepatitis C, diagnosis didasarkan pada adanya anti HCV dalam serum darah, menggunakan teknik ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Cara deteksi yang lebih sensitif dan spesifik adalah dengan mendeteksi RNA HCV dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*).³ Metode ini dikembangkan untuk mengatasi kelemahan metode diagnosis konvensional seperti imunologi dan mikrobiologi. Metode ini sangat penting terutama pada *window period*, suatu periode dimana telah terjadi infeksi hepatitis tetapi antibodi belum terbentuk/ terdeteksi. Sehingga PCR merupakan metode diagnostik standar untuk infeksi HCV akut maupun kronik.³ PCR merupakan tehnik cepat untuk mengamplifikasi fragmen DNA atau RNA spesifik secara *in vitro* dengan menggunakan 2 primer untai tunggal pendek. Dengan tehnik ini sejumlah kecil fragmen DNA/RNA akan diamplifikasi sampai jutaan kali.⁴ Dalam praktek oftalmologi, sampel untuk PCR biasanya diperoleh dari *swab* konjungtiva, parasintesis *anterior chamber* atau aspirasi vitreous, cairan air mata, dan kerokan epitel kornea.^{5,6} PCR dari cairan air mata merupakan salah satu tehnik yang *non-invasive* bila dibandingkan dengan pengambilan dari darah, selain itu secara tehnik lebih mudah, efisien dan sederhana.⁵ Ansari *et al* (2006) melakukan penelitian untuk mendeteksi virus hepatitis C pada pasien hemodialisis dengan membandingkan metode Elisa (EIA) dengan PCR dari darah, hasilnya didapatkan pada EIA

positif 5 kasus (41,6%) dan pada PCR didapatkan 12 kasus positif (100%) dari 12 kasus hepatitis yang diteliti.⁷ Heinz *et al*, melakukan penelitian dengan membandingkan virus hepatitis C di darah dengan di air mata menggunakan PCR, hasilnya HCV pada darah dan pada air mata ditemukan 33 kasus positif (100%), tetapi PCR pada air mata memberi sinyal yang lebih kuat dibandingkan dari plasma darah, dikarenakan pada air mata hanya didapatkan sejumlah kecil enzim degradasi.⁸ Amal *et al* (2011) juga melakukan penelitian dengan mendeteksi virus hepatitis c pada air mata pada penderita hepatitis kronik dengan 26 kasus positif dari 50 kasus (52%).⁹

2. Metode

Penelitian ini merupakan suatu penelitian observasional yang bersifat analitik dengan desain uji diagnostik untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan PCR virus hepatitis C pada air mata pasien hemodialisis di RSUP Mohammad Hoesin Palembang.¹⁰ Penelitian ini dilakukan di RSUP Mohammad Hoesin, dan Instalasi Hemodialisis RSUP Mohammad Hoesin. Keseluruhan waktu pelaksanaan terhitung mulai bulan Agustus 2014 sampai dengan Agustus 2015. Pemeriksaan PCR dilakukan di Mikrobiologi Klinik FK UNSRI Palembang dan Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Palembang. Populasi studi adalah semua penderita baru yang akan dilakukan tindakan hemodialisis di RSUP Mohammad Hoesin Palembang dengan hasil ELISA Anti HCV (+) maupun (-) serta bersedia diikutsertakan dalam penelitian ini. Sampel di rekrut secara konsekutif, yaitu semua pasien baru yang datang berobat ke unit hemodialisis di masukkan sebagai subyek, penderita dengan faktor resiko, seperti: riwayat transfusi darah, riwayat tattoo, dan bersedia ikut penelitian dengan menandatangani *informed consent*.¹¹ Sedangkan pasien yang sedang menderita infeksi okular yang mempengaruhi kualitas dan

kuantitas air mata tidak dimasukkan sebagai sampel studi. Setelah mendapatkan penjelasan secara rinci mengenai tujuan serta manfaat penelitian. Penderita juga dijelaskan mengenai pemeriksaan yang akan dilakukan, dan penderita diminta untuk menandatangani surat pernyataan bersedia untuk ikut dalam penelitian. Pada pemeriksaan awal, semua penderita telah menjalani pemeriksaan tajam penglihatan, pemeriksaan segmen anterior menggunakan *loupe*, pemeriksaan segmen posterior dengan oftalmoskop direk, dan kemudian dilakukan pengambilan sampel untuk bahan pemeriksaan PCR.¹² Teknik pengambilan sampel untuk mendeteksi HCV yang dilakukan dengan mengambil sampel spesimen darah sebanyak 2 cc dan sampel spesimen air mata yang dikumpulkan dengan menggunakan kertas filter *Schirmer test strip*.⁵ Kertas *schirmer* kemudian ditempatkan dalam botol steril dan disimpan pada -20°C sampai pengolahan dan semua sampel spesimen dilakukan pemeriksaan PCR: metode ekstraksi RNA, pembentukan cDNA, proses amplifikasi DNA dan elektroforesis gel agarosa, kemudian dilakukan proses visualisasi.¹³

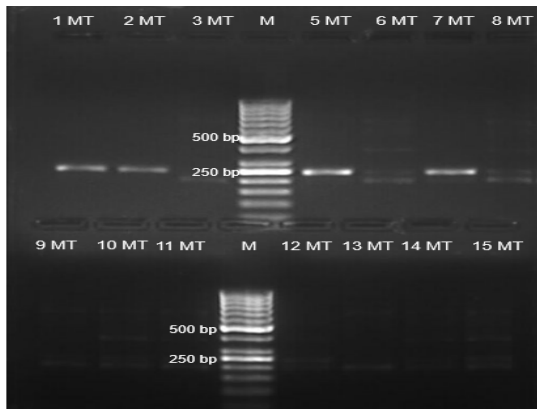


Gambar 1. Pengambilan sampel air mata dengan *schirmer strip*

3. Hasil

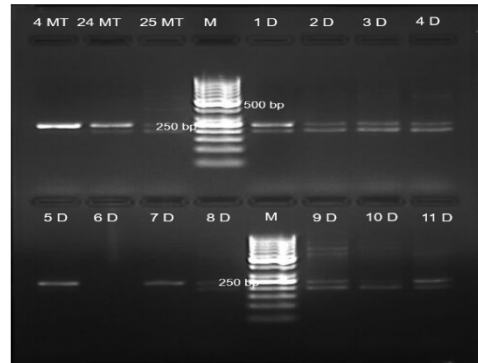
Dari 25 sampel penelitian, pada pemeriksaan dengan menggunakan primer CRABP2 gen HCV GP2 didapatkan pada sampel plasma darah terdapat 20 sampel (80%) positif virus hepatitis C, dan pada sampel air mata didapatkan 11 sampel (44%) positif virus hepatitis C.

Pada pita amplikon DNA HCV dengan sampel no.3,8,9,11,12,13,14,15,19, 22, 23, dan 25 ditemukan pita DNA positif virus hepatitis C pada darah sedangkan pada air mata didapatkan hasil HCV negative (gambar 2 dan 3).



Gambar 2. Amplikon dengan primer untuk mendeteksi virus hepatitis c dengan sampel air mata no.1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, dan 15, dengan pita DNA berkisar 250 bp menggunakan sepasang primer CRABP2 gen HCV GP2. Pada amplikon dengan primer sampel air mata no. 16, 17, 18, 20, 21, dan no. 24 juga didapatkan positif pita terdeteksi virus hepatitis c di 250 bp.

Pada uji diagnostik PCR virus hepatitis C pada air mata dan plasma darah, didapatkan nilai sensitivitas pada air mata adalah 72,73%, nilai spesifisitasnya adalah 13, 33%, dengan nilai prediksi positif adalah 40%, dan nilai prediksi negatif adalah 40% seperti yang terlihat pada tabel 1.



Gambar 3. Amplikon dengan primer untuk mendeteksi virus hepatitis c dengan sampel air mata no.4, 24, 25, dan amplikon dengan sampel plasma darah no 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, dan 11 dengan pita DNA berkisar 250 bp menggunakan sepasang primer CRABP2 gen HCV GP2. Begitu juga dengan amplikon sampel plasma darah no.12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 24, dan 25 didapatkan positif pita dengan pita DNA berkisar 250 bp menggunakan sepasang primer CRABP2 gen HCV GP2.

Tabel 1. Perbandingan sensitifitas dan spesifisitas PCR air mata dengan PCR plasma darah pada penelitian ini dengan kejadian hepatitis C

		Darah		
Air Mata		Positif	Negatif	Jumlah
	Positif	8	12	20
	Negatif	3	2	5
	Jumlah	11	14	25

4. Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan 44% sampel air mata terdeteksi adanya virus hepatitis C. Hal ini menunjukkan adanya viremia di dalam darah sampel pasien dan virus hepatitis C yang masuk ke kantung lakrimal pasien sampel penelitian sesuai dengan penelitian Heinz dkk (1994), Ansari dkk (2006), Amal dkk (2011), dan penelitian Mochamad Yusuf dkk (2012). Menurut penelitian Feucht dkk dalam studi di Jerman, menemukan adanya reaksi positif HCV RNA PCR di dalam plasma, air mata dan swabs dari mata, sehingga air mata juga merupakan spesimen yang bermakna atau material diagnostik yang layak untuk mendeteksi adanya HCV RNA.¹⁴

Seperti diketahui bahwa pasien hemodialisis merupakan faktor resiko tinggi untuk tertularnya virus hepatitis C.¹⁵ Karena pada penderita hemodialisis memiliki sistem imun yang rendah sehingga untuk terjadinya infeksi sangat mudah. Pada penelitian ini terdeteksi virus RNA HCV lebih banyak pada sampel plasma darah, hal ini diduga karena virus yang masuk ke kantung lakrimal lebih sedikit dibandingkan dengan viremia yang ada di darah.^{16,17} Pada penelitian yang dilakukan oleh Mendel dkk, ditemukan juga RNA HCV yang terdeteksi lebih banyak pada darah (76, 5%) dibandingkan RNA HCV di air mata (9, 8%). Mendel juga mengemukakan adanya RNA di dalam air mata tergantung dengan derajat keparahan dari hepatitis dan *viral load* yang diukur dengan *branched DNA assay*.¹⁸ Pada penelitian ini didapatkan pita amplikon DNA HCV dengan sampel no.3,8,9,11,12,13,14,15,19, 22, 23, dan 25 ditemukan pita DNA positif virus hepatitis C pada darah sedangkan pada air mata didapatkan hasil HCV negative (gambar 2 dan 3). Hal ini disebabkan viremia yang terjadi dimulai dari darah dulu, sedangkan virus tersebut belum masuk ke kantung lakrimal.¹⁹ Sedangkan pada amplikon pita DNA HCV sampel no. 16,17, dan 21 didapatkan hasil positif virus hepatitis C di air mata dan di darah negatif.²⁰ Hal ini dikarenakan masa akut viremia hepatitis C telah terlewati, tetapi virus tersebut masih ada di kantung lakrimal. Selain itu pada air mata didapatkan sejumlah kecil enzim degradasi seperti RNase, laktoferin dan lipokalin yang memberikan stabilitas tinggi di air mata sehingga masih memberikan hasil yang positif.²¹

Pada beberapa subjek sampel penelitian ditemukan adanya variasi dari signal positif pita DNA HCV, ini di duga terdapat beberapa kemungkinan yang timbul, (1) karena perbedaan konsentrasi *viral load* yang ada, dimana pengukuran *viral load* ini dapat dilakukan dengan pemeriksaan PCR secara

kuantitatif melalui pemeriksaan *branched DNA assay* dan juga pemeriksaan TMA (*Transcriptionmediated Amplication*).²² Tes ini dapat mengukur jumlah virus sampai sekecilnya (5-10 IU/ml). Adanya hubungan antara HCV RNA di air mata dengan *viral load* HCV di dalam darah, dan berkaitan juga dengan beratnya viremia, seperti yang dikemukakan oleh Amal dkk (2011).²¹ Jacobi dkk (2007) mengemukakan bahwa level HCV RNA di sampel air mata (*mean*, 1.0×10^4 *copies/ml*) lebih rendah dari sampel di darah (*mean*, 5.3×10^5 *copies/ml*), (2) adanya *mismatch*, yaitu adanya ikatan yang tidak spesifik antara DNTP,s dengan primer. Pada uji diagnostik virus hepatitis C dengan menggunakan PCR pada air mata dan plasma darah, didapatkan nilai sensitivitas pada sampel air mata adalah 72,73% yang berarti pemeriksaan ini cukup sensitif untuk mendeteksi HCV di air mata. Pada uji diagnostik, nilai sensitivitas harus cukup tinggi sehingga dapat memperlihatkan kemampuan untuk mendeteksi penyakit, sedangkan nilai spesifisitas pada sampel air mata adalah 13,33% yang berarti spesimen air mata tidak cukup spesifik untuk membedakan antara subjek yang benar-benar tidak sakit dengan subjek yang di duga menderita penyakit. Pada penelitian ini, didapatkan nilai akurasi sensitivitas air mata cukup tinggi dan nilai spesifisitasnya rendah, sehingga uji diagnostik pada penelitian ini baik untuk keperluan skrining. Skrining dilakukan untuk mencari penyakit pada subjek yang asimtomatis, sehingga dapat dilakukan pemeriksaan lanjutan agar diagnosis dini dapat ditegakkan. Sedangkan nilai akurasi untuk spesifisitasnya rendah, ini berarti air mata merupakan spesimen yang tidak spesifik untuk virus hepatitis C, karena ternyata virus hepatitis C ini dapat juga terdeteksi di spesimen yang lain seperti darah, saliva dan humor akuos.²³ Mendel dkk juga mengemukakan bahwa spesimen air mata dapat sebagai transmisi HCV tetapi sebagai

sumber RNA HCV di air mata masih memerlukan pemahaman lebih lanjut.^{18,24} Nilai prediksi positifnya adalah 40%, yang berarti kemungkinan seorang yang menderita penyakit hepatitis C sekitar 40% padahal penderita sebenarnya tidak sakit (positif semu). Nilai prediksi negatifnya adalah 40%, yang berarti probabilitas seorang yang tidak menderita penyakit hepatitis C sekitar 40% padahal sebenarnya subjek tersebut menderita hepatitis C. Pada nilai akurasi positif semu dan negatif semu didapatkan nilai sekitar 40% (cukup tinggi). Hal ini dikarenakan pada penderita hemodialisis mempunyai sistem imun yang rendah sehingga tubuh penderita tidak mampu memproduksi kadar antibodi yang cukup untuk terdeteksi didalam darah.²⁵

Keuntungan pada metode teknik PCR adalah sangat sensitif. Teknik PCR dengan sampel plasma darah mempunyai nilai sensitivitas dan spesifisitas 100% karena merupakan *gold standar*. PCR bertujuan untuk mengatasi kelemahan metode diagnosis konvensional seperti imunologi dengan sensitivitasnya sekitar 80%-90. Metode PCR ini sangat penting terutama pada *window period*, suatu periode dimana telah terjadi infeksi hepatitis tetapi antibodi belum terbentuk/terdeteksi, sehingga teknik PCR ini dapat mendeteksi RNA HCV satu hingga dua minggu setelah infeksi.^{26,27} Pada penelitian ini terdapat kelemahan, dimana penelitian ini bersifat kualitatif (semi kuantitatif), sehingga hanya bisa mendeteksi keberadaan HCV tetapi tidak mampu untuk mengukur *viral load*.²⁸ Disamping itu, kemungkinan adanya faktor kesulitan dalam teknik pemeriksaan, penyimpanan sampel yang kurang baik juga ikut mempengaruhi hasil yang didapat.

5. Kesimpulan

Pada uji diagnostik dengan pemeriksaan PCR virus hepatitis C pada air mata, didapatkan nilai sensitivitasnya sebesar 72,73% dan nilai spesifisitasnya sebesar 13,33% sehingga air

mata merupakan spesimen yang cukup sensitif tetapi tidak spesifik, oleh sebab itu teknik ini dapat dipakai untuk skrining virus hepatitis C pada pasien hemodialisis.

Daftar Pustaka

1. Andri S, Soewignjo S D. Hepatitis viral akut, Hepatitis B kronik, Hepatitis C. In: Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. V. 2009. p. 644–66.
2. Hans G et al. The Chemical Composition of Normal Human Red Blood Cells, including Variability among Centrifuged Cells. 2014;10:370–6.
3. Lina, MR, Budiman B DS. Uji PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk deteksi virus hepatitis C. In: Risalah Seminar Imiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi. 2004.
4. John MS et al. Methods in Molecular Biology. In: PCR Protocols. Second. 2003. p. 29–43.
5. Andreas P et al. Schirmer Strip vs. Capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. Ann. Anatomy. 2013. 1–6 p.
6. Dutta Parthopratim M et al. Polymerase Chain Reaction in Ophthalmology. AIOS, C Ser. 2012;22:11–6.
7. M, Ansari et al. Evaluation of Diagnostic value of Elisa method (EIA) & PCR in Diagnosis of Hepatitis C virus in Hemodialysis Patients. Hepat Mon. 2006;(6):19–23.
8. Heinz-HF et al. Greater Amount of HCV-RNA in Tears Compared to Blood. 1994;38(2):157–8.
9. Francesco N. Uji PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk deteksi virus hepatitis C. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;(11):77–8.
10. Rekam Medik Instalasi Hemodialisa RSUP Mohammad Hoesin. Palembang; 2011.

11. Puspo Negoro H D. Uji Diagnostik. In: S S, S I, editors. *Buku Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Ketiga. Jakarta: Sagung Seto; 2008.
12. Yuwono. *Paduan Eksperimen PCR Untuk Memecahkan Masalah Biologi Terkini*. In: Dheweberta Hardjono, editor. *Buku Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta; 2006. p. 1, 33, 169.
13. Jonathan P. The Polymerase Chain Reaction (PCR) for Human Viral Diagnosis. *PCR Detect Anal Hepat viruses*. 1995;(5):60–5.
14. H Feucht et al. Tear Fluid of Hepatitis C Virus carriers could be Infectious. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2202–3.
15. G, Alessandra et al. Extrahepatic Manifestations of Chronic HCV Infection. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2007;16(1):65–73.
16. Akintunde J et al. Tears Production: Implication for Health Enhancement. *Open Access Sci Reports*. 2012;(1):476.
17. Joukar F et al. Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in Haemodialysis Patients of Gulian, Northern Islamic Republic Iran. *East Mediterr Heal J*. 2012;18(3):236–9.
18. Mendel et al. Detection and genotyping of the hepatitis C RNA in tear fluid from patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 1997;51(3):231–3.
19. Monica. A et al. Dry Eye Disease Caused by Viral Infection: Review. *Arq Bras Oftalmol*. 2013;76(2):129–32.
20. Debnath et al. Prevalence of Hepatitis B and C among Hemodialysis Patient of Tripura, India. *Euroasian J Hepato-Gastroenterology*. 2012;2(1):10–3.
21. Atta Amal et al. Detection of Hepatitis C virus in Tear Fluid of Patients with Chronic Hepatitis C. *Egypt J Med Microbiol*. 2011;20:183–9.
22. J Christopher, Reed S. Detection of the Hepatitis C virus by RT-PCR. 2008;24:301–6.
23. A.Tsoumani et al. Treatment and non-treatment related ocular manifestations in patients with chronic hepatitis B or C. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17:1123–31.
24. Komatsu H et al. Tears from Children with Chronic Hepatitis B Virus (HBV) Infection Are Infectious Vehicles of HBV Transmission: Experimental Transmission of HBV by Tears, using mice with Chimeric Human Livers. *J Infect Dis*. :1–8.
25. Moini et al. Hepatitis C Virus (HCV) Infection Rate among Seronegative Hemodialysis Patients Screened by Two Methods; HCV Core Antigen and Polymerase Chain Reaction. *Hepat Mon*. 2013;13(6):1–5.
26. Reddy AK et al. Utility of HCV Core Antigen Elisa in The Screening for Hepatitis C Virus Infection in Patients on Hemodialysis. *Indian J Med Microbiol*. 2006;24(1):55–7.
27. Sharifi et al. . The Usefulness of Anti-HCV Signal to Cut-off Ratio in Predicting Viremia in Anti-HCV in Patients With Hepatitis C Virus Infection. *J Microbiol*. 2015;8(4):1–3.
28. Amin M et al. The Prevalence and Subtype Distribution of Hepatitis C Virus Infection among Hemodialysis Patients in a Private Hospital in Surabaya, Indonesia. *Microbiology*. 2012;6(4):173–9.