

University of Groningen

Linezolid in multidrug-resistant tuberculosis

Bolhuis, Mathieu

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Bolhuis, M. (2015). *Linezolid in multidrug-resistant tuberculosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Summary

In this thesis, the general aim was to describe the clinical pharmacology of linezolid in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). In order to do so, several aims were formulated to shed light on different pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) aspects of linezolid in MDR-TB. Since treatment regimens have to be composed of at least four anti-TB drugs that are likely to be effective and since the number of new-drugs that emerge from the pipeline is limited, clinicians are forced to use drugs with limited knowledge about safety and efficacy to treat these patients. One of these drugs, the oxazolidinone linezolid, is used off-label in the treatment of MDR-TB. Linezolid holds promise to be highly effective in treatment regimens of MDR-TB, however linezolid is infamous for its adverse events, such as peripheral and optical neuropathy, anaemia, and myelosuppression. Because of these adverse events clinicians often feel forced to withdraw linezolid from MDR-TB treatment regimens. This is particularly important in patients that are infected with *Mycobacterium tuberculosis*, a microorganism that is only susceptible for few selected drugs.

To reduce toxicity, dose reduction was studied and obviously, this helped to reduce adverse events. However, dose reduction should never compromise treatment efficacy, since reduced efficacy can result in failing treatment regimens, acquired resistance and even death. To help clinicians manoeuvre through the field of toxicity while retaining efficacy, we aim to contribute to the knowledge of PK and PD of linezolid in MDR-TB with special focus on TDM of linezolid to optimize treatment of patients suffering from MDR-TB.

Pharmacokinetics of linezolid

In order to attain our objectives, in **Chapter 2**, we performed a literature search on drug-drug and drug-food interactions of anti-microbial drugs, including those used in multidrug-resistant tuberculosis treatment regimens, such as clarithromycin and linezolid. The pharmacokinetic interactions, as described in **Chapter 2**, are a modified version of a published manuscript with a broader scope, studying other antimicrobial drugs as well. For each drug that was studied, including linezolid (oxazolidinones) and clarithromycin (macrolides), literature was searched using the Medical Subject Headings (MeSH) term 'drug interaction' combined with the drug name and group name. The search was confined by different limitations, with the goal of improving the quality of the search results. For oxazolidinones, the search also aimed to reveal drug-interactions of other, not yet commercially available drugs of the oxazolidinone group, e.g. sutezolid (PNU-100480),

posizolid (AZD2563), radezolid (RX-1741), and torezolid (TR-701). Due to the recent discovery of some of these drugs and due to the limited post-marketing knowledge of linezolid, the number of drug-interactions studies was very limited on linezolid, and even absent on the other oxazolidinones.

The results revealed, that a fat meal decreased linezolid absorption and antacids had no clinical significant effect on absorption of linezolid. The metabolism of linezolid appeared not to be influenced by CYP modulators, however literature suggests that linezolid might be a P-glycoprotein (P-gp) substrate.

From this literature study, we concluded that there are drug-drug and drug-food PK interactions with linezolid, with variable relevance. The change in PK parameters of linezolid might influence therapy through increased toxicity or decreased efficacy. Finally, the sheer amount of pharmacokinetic drug interactions, with linezolid, but also other antimycobacterial drugs, require multidisciplinary vigilance of physicians, pharmacists, and other health care professionals.

Chapter 3 focuses on one of these pharmacokinetic drug-drug interactions. As a part of routine therapeutic drug monitoring (TDM) at the Tuberculosis Center Beatrixoord (Haren, the Netherlands), we discovered a drug-drug interaction between linezolid and clarithromycin in a 42-year-old male TB-patient. In this patient, the area under the time concentration curve (AUC_{0-12h}) of linezolid was increased from 29 mg*h/L to 108 mg*h/L. Based on co-administrated medication, lack of significant changes in his liver or renal function, and coincidence with the start of co-administration of clarithromycin 1000 mg once daily, we hypothesised that there might be an interaction between linezolid and the potent P-gp pump inhibitor clarithromycin.

Based on this observation, a prospective, single-arm, fixed-order study was designed to quantify the interaction. Male and female patients aged ≥ 18 years who were diagnosed with MDR-TB were eligible for inclusion in our study. Pregnant or lactating patients, subjects that had previously shown hypersensitivity to linezolid or macrolide antibiotics, patients that had hypokalaemia or concomitantly received P-glycoprotein modulators were excluded. All patients received linezolid 300 mg twice a day. The AUC was determined at three time points in the study: at baseline, after two weeks of co-administration of linezolid with 250 mg clarithromycin once daily, and finally after two weeks of co-administration of linezolid with 500 mg clarithromycin.

In concordance with the calculated sample size, five of the seven included patients were suitable for evaluation. The median (interquartile range, IQR) of linezolid AUC was 36.3 (33.2 – 46.3) mg^{*}h/L without co-administration of clarithromycin. After co-administration with 250 mg clarithromycin once daily, the median (IQR) linezolid AUC increased to 61.0 (34.6 – 63.9) mg^{*}h/L ($p=0.686$) and after 500 mg clarithromycin to 67.2 (66.9 – 76.0) mg^{*}h/L ($p=0.043$). In other words, linezolid exposure increased by a median (IQR) of 44% (23 – 102%) after co-administration with 500 mg clarithromycin compared to baseline, whereas 250 mg clarithromycin had no statistically significant effect. As for safety and tolerability, co-administration was well tolerated by most patients; none experienced severe adverse effects, one patient reported Common Toxicity Criteria grade 2 gastrointestinal adverse events. Based on this study, we concluded that further research in a larger cohort is needed to provide insight into the observed inter-patient variation, perhaps caused by genetic variability polymorphism. Furthermore, we concluded that TDM of linezolid is advisable when linezolid is co-administrated with clarithromycin until effect size of the PK interaction becomes predictable.

Despite the advisable nature of TDM when administering linezolid with or without clarithromycin, in many parts of the world conventional sampling might be hindered by logistical problems. In order to facilitate easy analysis of the anti-TB drugs linezolid, we developed and clinically validated two new sampling methods using dried blood spot (DBS) and oral fluid analysis (**Chapter 4**).

In order to clinically validate the DBS sampling, we recruited patients that were admitted to Tuberculosis Center Beatrixoord (Haren, the Netherlands) that were receiving linezolid as part of their treatment regimen for MDR-TB for whom routine TDM was scheduled. Sampling was performed at steady-state. Venous blood samples were obtained before drug intake, and at 1, 2, 3, 4, and 8 hours after drug intake. The venous blood samples were used as a control, but also to generate venous dried blood spots (vDBS) by dropping 50 μ L onto Whatman 31 ET CHR paper. DBS samples were obtained at 2 and 8 hours after dosing by dropping blood from a finger prick, directly on DBS paper. Both the vDBS and DBS samples were dried at room temperature and stored in sealed plastic bags with desiccant sachets at -20°C until analysis. Just before analysis, an 8-mm-diameter disc was punched out of each (v)DBS after which extraction of these discs was performed. After further sample preparation, the samples were analysed using a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method. The DBS analytical method was validated in accordance with the U.S. Food and Drug Administration guidance. Besides these common

validation tests, special tests were performed to evaluate the impact of haematocrit value (Hct) at 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 50%, and blood spot volume set at 30, 50, 70, and 90 μL . Blood spot volume and Hct values were set at 50 μL and 35% during the validation of the analysis to represent tuberculosis patients.

The DBS assay showed linearity over the analytical concentration range (0.05 – 30 mg/L linezolid) with a pooled correlation coefficient, r^2 , of 0.9947. Reproducibility, presented as bias and coefficient of variation (CV) were less than 17.2% for the lower limit of quantification (0.05 mg/L linezolid), and less than 7.8% for other levels (0.25 – 30 mg/L linezolid). The method showed a high recovery of approximately 95% and a low matrix effect less than 8.7%. DBS samples proved to be stable for 2 months at 37°C. Bland-Altman analysis revealed that the ratio of the linezolid concentration in DBS to that in plasma was 1.2 (95% confidence interval [CI], 1.12 – 1.27).

From this study, we concluded that DBS analysis of linezolid might be a useful tool for TDM of linezolid in the treatment of MDR-TB patients. The easy sampling procedure and high sample stability may be useful, especially in underdeveloped countries with limited resources and where conventional plasma sampling is not feasible.

In **Chapter 4**, we also developed and clinically validated an oral fluid sampling method. Patients that took part in the prospective study described in chapter 3 were included. All patients received 300 mg linezolid twice daily and 250 mg clarithromycin once daily when the steady state blood and oral fluid samples were obtained. The samples were collected simultaneously before and at 1, 2, 3, 4, 8, and 12 h after drug intake. Oral fluid samples were collected using a small cotton roll (Salivette; Sarstedt, Leicester, United Kingdom). Patients chewed on the Salivette for approximately two minutes after which the samples were centrifuged and then stored at -20°C until analysis. Linezolid and clarithromycin concentrations were analysed using validated LC-MS/MS analysis methods.

Passing-Bablok regressions and Bland-Altman analysis revealed oral fluid analysis of linezolid to be suitable for TDM in MDR-TB patients as an alternative for conventional serum analysis. Since the ratio of the linezolid concentration in serum to that in oral fluid was calculated to be 0.97 (95% CI, 0.92 to 1.02) using Bland-Altman analysis, no correction factor is needed for the interpretation of linezolid oral fluid concentrations. However, the Bland-Altman analysis of clarithromycin concentration serum / oral fluid revealed a ratio of 3.07 (95% CI, 2.45 to 3.69). We observed a non-linear relationship between the concentrations of the metabolite of clarithromycin, hydroxycarithromycin, in serum and in oral fluid. Based on

this study, we concluded that the analysis of linezolid and clarithromycin in oral fluid might be an easy, non-invasive alternative in MDR-TB patients when conventional sampling might not be possible or desirable.

Previous chapters, but also studies on inter- and intra-patient variability of linezolid pharmacokinetics performed by other research groups, indicate that there might be an important role for TDM. Nevertheless, several recent studies did not incorporate TDM data in their research. Therefore, we advocated the use of TDM combined with drug susceptibility testing, among other things, in two letters to the editor (**Chapter 5**). Also, we pointed out the importance of directly observed therapy (DOT) in clinical trials, except perhaps in cases where compliance is highly probable. Furthermore, we suggested that a randomised controlled trial of linezolid versus a placebo should be designed and planned, in addition to an adequate background regimen that is designed using DST and TDM.

The suggestions that we made based on these recent studies, encouraged us to retrospectively study linezolid efficacy, safety, and tolerability in relation to linezolid pharmacokinetics in our Tuberculosis Center Beatrixoord (Haren, the Netherlands). In order to increase the sample size, an international collaboration was initiated allowing for inclusion of multidrug-resistant tuberculosis patients from the E. Morelli Hospital (Sondalo, Italy) as well. We selected MDR-TB patients that received linezolid as a part of their treatment regimen, excluding patients younger than 18 years, patients lacking data due to recent admission to either reference hospital, and patients of whom no TDM data were available. Two researchers retrieved anonymous retrospective data, including patient characteristics, treatment information, pharmacokinetic data, and treatment outcome.

In both centers, a combined number of 58 MDR/XDR-TB patients that had received linezolid and underwent TDM were included. However, of 54 eligible patients in Sondalo, 36 had to be excluded, of whom 27 due to absence of pharmacokinetic data of linezolid. In the combined cohort, DST revealed a median (IQR) MIC for linezolid of 0.5 (0.25 – 0.5) mg/L. Of the 58 included patients, 29/58 (50.0%) patients were considered cured; 4/58 (6.9%) patients completed their treatment; and 25/58 (43.1%) patients were still on treatment at the moment of data collection. All but one patient (98.3%), including those still on treatment, were culture and smear-microscopy negative when data were collected. In this combined cohort, no correlation was observed between microscopy or culture conversion and the pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters, the AUC/MIC ratio, which were above the proposed target in almost all cases.

Retrospective analysis pointed out that patients with peripheral neuropathy had received a higher median (IQR) cumulative dose (1,829 (1,414 – 2,255) mg/kg versus 1,164 (755 – 1,922) mg/kg ($p=0.041$)) or received linezolid for a longer median (IQR) period of time (159 (120 – 196) versus 97 (66 – 147) days ($p=0.003$)) compared to patients without peripheral neuropathy. Another interesting finding from this study was that co-administration of erythropoietin with linezolid had no effect on preventing anaemia. At 0, 30, 60, and 90 days after starting linezolid, there was no difference between haemoglobin (Hb) of patients that did or did not receive erythropoietin, nor was there a difference in Hb over time per patient between the two groups.

From our retrospective study, we concluded that the treatment regimens containing linezolid were effective and well tolerated. High sputum microscopy and culture conversion rates and low frequency of adverse events were observed in our cohort. Furthermore, we concluded that peripheral neuropathy seemed to be mediated by cumulative dose and days of exposure to linezolid. We were not able to observe a relevant correlation between pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters, such as AUC/MIC ratio, and efficacy parameters. Perhaps this is due to the fact that in our cohort almost every patient had an AUC/MIC ratio of >100 .

Pharmacodynamics of linezolid

Although in this thesis most emphasis is placed on pharmacokinetic of linezolid, in **Chapter 6** we focused on a pharmacodynamic interaction between linezolid and clarithromycin *M. tuberculosis* isolates. In collaboration with the Dutch National Mycobacteria Reference Laboratory (Bilthoven, the Netherlands), we performed an *in vitro* synergy test using the checkerboard method. A panel of 24 *M. tuberculosis* isolates were randomly selected from their collection. We used two previously described methods, *i.e.* the absolute concentration method (ACM) and the MGIT 960 system, with varying concentrations of drugs. Linezolid was added in concentrations between 0 – 0.5 mg/L and clarithromycin with a range of 0 – 8 mg/L in a checkerboard fashion. After growth inhibition was determined for all combinations of isolates and concentrations, we calculated the lowest fractional inhibitory concentration (FIC) to determine synergy. The FIC was calculated as: (MIC of linezolid in combination / MIC of linezolid alone) + (MIC of clarithromycin in combination / MIC of clarithromycin alone), and defined synergy as an $FIC \leq 0.5$, indifference as $0.5 < FIC \leq 4$, and antagonism as $FIC > 4$.

Of the 24 selected *M. tuberculosis* isolates, synergy between clarithromycin and linezolid was determined for 74% by using the MGIT method and in 59% by using the ACM. No antagonism was observed. Since the combination is most likely to be co-administered in MDR-TB patients, we also focused on MDR-TB isolates. In these MDR-TB isolates (n=13), synergy was observed in 77% using MGIT and in 46% using the ACM method with a median (IQR) FIC of 0.37 (0.32 – 0.37) and 0.62 (0.375 – 1.0) respectively. Based on these data, we concluded that clarithromycin and linezolid display *in vitro* synergy in multidrug-resistant *M. tuberculosis* isolates. The *in vitro* synergy that was observed in this study might play a role in designing future MDR-TB treatment.

In **Chapter 7** we discussed whether the objectives of this thesis, as presented in the general introduction, were met. Furthermore, we placed the most important findings from this thesis in perspective of published literature and clinical practice. For instance, we explained the importance of pharmacokinetic drug-drug interaction studies of anti-TB drug as a *victim*, but also as a *perpetrator*. Moreover, we explained the importance of individualized treatment regimens and defined targets for therapeutic drug monitoring. Finally, we discussed future perspectives following from the results of this thesis. These future perspectives include the possible impact of the patent of linezolid expiring in the following years and subjects that warrant future study based on the studies that were performed for this thesis.



Nederlandse samenvatting

Tuberculose

Wereldwijd overlijden jaarlijks meer dan één miljoen mensen aan de infectieziekte tuberculose. Tuberculose wordt veroorzaakt door tuberkelbacillen die officieel worden aangeduid als *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculose wordt meestal overgedragen van mens tot mens via het inademen van tuberkelbacillen, die in wolken van fijne druppels – aërosolen – via de lucht worden verspreid door mensen met besmettelijke tuberculose. Door hoesten en niezen kunnen anderen besmet worden, vooral wanneer deze mensen langdurig met de besmettelijke tuberculosepatiënt in dezelfde ruimte verblijven, en als die ruimte weinig geventileerd wordt. Na het inademen van deze druppels met bacteriën zorgt het afweersysteem meestal dat de bacteriën opgeruimd worden. Bij ongeveer 10% van de mensen met een normale afweer is het afweersysteem niet in staat de bacterie voldoende te bestrijden. In deze gevallen nestelt de bacterie zich in het lichaam. Meestal ontstaat er vervolgens een latente, oftewel slapende, tuberculose-infectie waarbij de patiënt geen klachten en ziekteverschijnselen ontwikkelt. Als het afweersysteem te zwak is kan tuberculose ontstaan doordat de tuberkelbacil ‘wakker’ wordt en weer gaat delen. In de meeste gevallen gebeurt dit binnen enkele maanden of jaren na de besmetting, soms later. De besmette persoon krijgt dan klachten, meestal in de vorm van hoesten, nachtzweeten en ongewild gewichtsverlies. De tuberkelbacil komt vrijwel altijd via de luchtwegen het lichaam binnen en veroorzaakt daar de meeste ziekteverschijnselen. De bacterie kan ook op andere plaatsen in het lichaam opduiken en daar bijna alle organen aantasten. Voorbeelden hiervan zijn de longvliezen, de lymfeklieren, de darmen, het buikvlies, de nieren, de geslachtsorganen, de lever, de hersenvliezen, de hersenen en de botten, vooral die van de wervelkolom.

Multiresistente tuberculose

Bij iedere celdeling van de tuberkelbacil kan door toeval een fout, oftewel een mutatie, ontstaan. Af en toe ontstaat hierbij een mutant, oftewel een gemuteerde bacterie, die ongevoelig is voor een bepaald tuberculosemedicament. Het aantal bacteriën bij patiënten met tuberculose is enorm groot. Tussen al die bacteriën zijn er altijd enkele mutanten die tegen een of ander antibioticum resistent zijn. Deze mutanten zouden overleven wanneer de behandeling alleen met dit ene antibioticum, waartegen ze resistent zijn, zou plaatsvinden. Bij opeenvolgende fouten in de behandeling waarbij telkens maar één antibioticum wordt gebruikt, kan een patiënt uiteindelijk een infectie hebben met bacteriën die resistent zijn tegen meerdere middelen tegelijk. Om dit te voorkomen moet bij de behandeling van tuberculose altijd een combinatie van verschillende antibiotica gebruikt worden.

Er kan een situatie ontstaan waarbij de bacterie niet meer gevoelig is voor de standaard-behandeling met isoniazide, rifampicine, pyrazinamide en ethambutol, waarmee wereldwijd veel ervaring is opgedaan. Als de bacterie ongevoelig is voor de twee meest gebruikte en krachtigste middelen, namelijk rifampicine en isoniazide, spreekt men van multiresistente tuberculose (MDR-TB). Helaas komt MDR-TB vaak voor. Op basis van gegevens van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) denken we dat 3,6 – 20% van de nieuwe tuberculosepatiënten besmet is met MDR-TB.

Wanneer een patiënt besmet is met MDR-TB is de behandeling veel complexer dan die bij normaal gevoelige tuberculose, aangezien in het geval van MDR-TB de meest efficiënte middelen per definitie niet kunnen worden ingezet als onderdeel van de behandeling. Omdat deze middelen, rifampicine en isoniazide, niet gebruikt kunnen worden voor de behandeling van de tuberculose dient er uitgeweken te worden naar reserve-antibiotica. Volgens de behandelrichtlijn van de WHO behoort de medicamenteuze behandeling van MDR-TB te bestaan uit een combinatie van tenminste vier antibiotica waarvoor de bacterie hoogstwaarschijnlijk nog gevoelig is. Artsen hebben hierbij beschikking over vijf verschillende groepen reserve-antibiotica op basis van een indeling van de WHO. In de vijfde groep zitten de antibiotica linezolid en claritromycine. Op dit moment is er echter relatief weinig ervaring met de behandeling van MDR-TB met deze middelen en is er nog weinig bekend over de effectiviteit bij tuberculose. Hierdoor dient de patiënt geen zes maanden, maar soms tot 24 maanden te worden behandeld en is het onzeker of de patiënt überhaupt kan genezen. Wanneer de kennis over de effectiviteit, bijwerkingen en veiligheid van linezolid en claritromycine bij de behandeling van MDR-TB zou toenemen, zouden deze middelen mogelijk een grotere rol kunnen krijgen bij de behandeling.

Farmacologie

Om geneesmiddelen effectief in te kunnen zetten bij een medicamenteuze behandeling is kennis van de farmacologie van de toegepaste geneesmiddelen nodig. Farmacologie is de wetenschap die zich bezighoudt met de wisselwerking van het werkzame bestanddeel van een geneesmiddel met het aangrijppingspunt waar het middel moet werken. Bij infectieziekten zoals tuberculose dient het geneesmiddel aan te grijpen op levende tuberkelbacillen. De farmacologie bestaat uit twee onderdelen: farmacokinetiek en farmacodynamie. Farmacokinetiek beschrijft ruwweg wat het lichaam met het geneesmiddel doet en farmacodynamie hoe het geneesmiddel aangrijpt op het ziekteproces in het lichaam. Bij infectieziekten is dat vooral hoe het middel de ziektekiem aanpakt.

Het begrip farmacokinetiek beschrijft de reis van een geneesmiddel door het lichaam. Die reis begint bij opname of absorptie uit het maag-darmkanaal. Na inslikken moet het middel uit het darmkanaal opgenomen worden in het bloed. Vervolgens wordt het middel over het lichaam verdeeld (distributie), omgezet (metabolisme) en uitgescheiden (eliminatie). In combinatie met de dosering van het geneesmiddel hebben deze processen een concentratie van het geneesmiddel in het lichaam als gevolg. In algemene zin kan gezegd worden dat een te hoge concentratie in relatie tot farmacodynamische parameters giftige bijwerkingen kan veroorzaken. Daartegenover staat dat bij een te lage concentratie het geneesmiddel onwerkzaam is. Bij antibiotica kan een te lage concentratie de bacteriën met verminderde gevoeligheid selecteren waardoor uiteindelijk zelfs resistentie kan ontstaan.

Onderzoek naar farmacokinetiek richt zich vaak op het meten van de concentratie van een geneesmiddel in het lichaam. Het liefst zouden we de concentratie meten op de plaats waar het geneesmiddel moet werken, maar dat lukt eigenlijk alleen als we een weefselmonster van een aangedaan lichaamsdeel zouden verwijderen voor onderzoek. We gaan er van uit dat het geneesmiddel via de bloedbaan bij de infectiehaard moet komen en dat in ontstoken weefsel de bloedvoorziening voldoende is, zodat de bloedconcentratie overeenkomt met de weefselconcentratie van het geneesmiddel. In de farmacokinetiek worden meestal bloedmonsters gemeten. Naast bloedmonsters kunnen echter ook urine- en speekselmonsters gebruikt worden of een gedroogde bloeddruppel uit een vingerprik op een papier, de zogeheten *dried blood spot* (DBS). Farmacodynamisch onderzoek bij tuberculose bestaat veelal uit laboratoriumonderzoek naar de gevoeligheid van bacteriën voor specifieke geneesmiddelen.

Beide bovenstaande begrippen kunnen gecombineerd worden: farmacokinetiek / farmacodynamie (PK/PD). PK/PD relateert de gemeten concentratie van het geneesmiddel aan de benodigde concentratie, op basis van de gevoeligheid van de bacterie, op de plek van de infectiehaard. Het doseren op basis van PK/PD noemt men *therapeutic drug monitoring* (TDM). Met behulp van TDM zou onderzocht kunnen worden in hoeverre de concentratie van of blootstelling aan linezolid aansluit bij de gevoeligheid van de bacterie. Als de concentratie of blootstelling te hoog is, kunnen vermijdbare bijwerkingen of vergiftigingsverschijnselen optreden. De dosering van het geneesmiddel moet dan verlaagd worden. Wanneer de concentratie of blootstelling te laag is, zou de dosering van het geneesmiddel juist moeten worden verhoogd om onderbehandeling en resistentie te voorkomen.

Linezolid

Linezolid is een oxazolidinone-antibioticum dat geregistreerd is voor de behandeling van infecties van de huid en de longen met resistente stafylokokken. Linezolid wordt ook ingezet tegen MDR-TB, alhoewel het daarvoor niet geregistreerd is. Er zijn aanwijzingen dat linezolid een erg effectief geneesmiddel is in de behandeling van MDR-TB. Een nadeel is echter dat linezolid bekend staat om zijn bijwerkingen. De belangrijkste bijwerkingen zijn beschadiging van de oogzenuw, doofheid en prikkeling in de benen, voeten en handen door zenuwbeschadiging (perifere neuropathie), bloedarmoede en een onderdrukte bloedaanmaak in het beenmerg. Door deze bijwerkingen zien artsen zich vaak gedwongen te stoppen met toediening van linezolid als onderdeel van de tuberculosebehandeling. Voor de patiënt kan het moeten stoppen met linezolid zeer nadelige gevolgen hebben aangezien de multiresistente bacterie vaak slechts voor een paar geneesmiddelen gevoelig is.

Uit onderzoek is gebleken dat het verlagen van de dosering van linezolid het aantal bijwerkingen kan verminderen. Een gevaar van het verlagen van de linezoliddosering is echter dat dit de effectiviteit van linezolid in het gedrang kan brengen. Dit zou het falen van de behandeling, ontwikkelen van ongevoeligheid van de bacterie voor linezolid en zelfs overlijden van de patiënt tot gevolg kunnen hebben.

Het doel van dit proefschrift is om zorgverleners te ondersteunen bij het manoeuvreren tussen enerzijds voldoende werkzaamheid en anderzijds bijwerkingen van linezolid door de klinische farmacologie van linezolid te onderzoeken wanneer het wordt ingezet bij de behandeling van MDR-TB. Hierbij wordt specifiek aandacht besteed aan de mogelijke rol van TDM bij het optimaliseren van de behandeling met linezolid.

Een ander belangrijk probleem is dat linezolid nooit alleen, maar altijd in combinatie met andere geneesmiddelen moet worden gegeven, terwijl de patiënt misschien ook nog andere geneesmiddelen krijgt. Al die geneesmiddelen kunnen met elkaar botsen: het ene middel kan de concentratie van het andere beïnvloeden, bijvoorbeeld doordat beide middelen op dezelfde manier in de lever worden omgezet of doordat de uitscheiding wordt beïnvloed. In dit proefschrift is daarom een literatuuroverzicht van de verschillende farmacokinetische interacties tussen geneesmiddelen opgenomen. Een interactie tussen linezolid en claritromycine, die beide worden ingezet bij de behandeling van MDR-TB, hebben we daarom speciaal bestudeerd. Hiernaast hebben we een tweetal nieuwe methodes opgezet om linezolid te meten in speeksel en DBS. We hebben de meetmethode van speekselmonsters en de toepasbaarheid hiervan in de praktijk onderzocht. Ook hebben we de linezolidblootstelling

en bloedconcentratie onderzocht in eerder afgenomen monsters, waarbij we vooral aandacht hebben besteed aan de effectiviteit, veiligheid en verdraagbaarheid bij MDR-TB patiënten. Tenslotte is een van de doelen om in het laboratorium te onderzoeken in hoeverre er een farmacodynamische beïnvloeding is tussen linezolid en claritromycine in MDR-TB bacteriën. Door middel van bovenstaande doelen beogen we meer inzicht te krijgen in de farmacologie van linezolid bij de behandeling van MDR-TB, met bijzondere aandacht voor TDM.

Resultaten

In **hoofdstuk 2** beschrijven we een literatuuronderzoek naar interacties van enkele antibiotica met andere geneesmiddelen of voedsel. In het literatuuronderzoek is niet alleen gezocht naar interacties met het antibioticum linezolid, maar ook naar vele andere verschillende antibiotica. Voor een betere leesbaarheid hebben we ervoor gekozen om in **hoofdstuk 2** alleen de resultaten van het onderzoek naar de oxazolidinone-antibiotica, inclusief linezolid, weer te geven. **Hoofdstuk 2** is daarom een voor het onderwerp van dit proefschrift aangepaste versie van het oorspronkelijke onderzoek.

We hebben de literatuur op een systematische manier doorzocht op alle geneesmiddelen die binnen het bereik van het onderzoek vielen. We gebruikten de zoekterm ‘*drug interaction*’ (geneesmiddelinteractie) uit het gestructureerde trefwoordensysteem, de *Medical Subject Headings* (MeSH) database. Deze zoekterm combineerden we met de generieke geneesmiddelnaam en de naam van de geneesmiddelgroep. Om het aantal resultaten te beperken en de kwaliteit van de resultaten te verhogen, hebben we vervolgens enkele filters toegepast. Zo werden bijvoorbeeld alleen Engelstalige wetenschappelijke artikelen geselecteerd voor het literatuuronderzoek. Uit de geneesmiddelgroep oxazolidinonen hebben we op de generieke geneesmiddelnaam linezolid en op de nog niet commercieel verkrijgbare geneesmiddelen uit de zelfde groep: sutezolid (PNU-100480), posizolid (AZD2563), radezolid (RX-1741) en torezolid (TR-701) gezocht.

Het aantal onderzoeken dat geneesmiddelinteracties beschreef met linezolid of een van de andere oxazolidinone-antibiotica was beperkt. Mogelijk speelt het feit dat enkele van deze geneesmiddelen pas recent ontdekt zijn en dat er slechts beperkte ervaringsgegevens bij patiënten bekend zijn hierbij een rol. Een vette maaltijd bleek de opname van linezolid vanuit de darm te verminderen. De opname van linezolid vanuit de darm werd niet of nauwelijks verstoord door het gebruik van maagzuurremmers.

Er zijn interacties van linezolid met enkele geneesmiddelen bekend die de concentratie van linezolid in het lichaam kunnen beïnvloeden. Er worden verschillende mechanismen geopperd om die interacties te verklaren. Zo zouden de geneesmiddelen de omzetting van linezolid beïnvloeden door verandering van het belangrijke ontgiftingssysteem in de lever, het zogenaamde *cytochroom P450* enzymstelsel. Andere auteurs denken dat de waargenomen geneesmiddelinteracties veroorzaakt zouden kunnen worden door de beïnvloeding van de effluxpomp P-glycoproteïne.

Geconcludeerd kan dus worden dat er enkele interacties zijn tussen het antibioticum linezolid en andere geneesmiddelen, maar ook met voedsel. In de praktijk zijn deze interacties niet allemaal even belangrijk. De veranderde farmacokinetische parameters zouden de behandeling van MDR-TB direct kunnen beïnvloeden door middel van toxiciteit of verminderde effectiviteit van het antibioticum, maar ook indirect door beïnvloeding van middelen voor de behandeling van andere kwalen dan tuberculose. Tenslotte laat het grote aantal geneesmiddelinteracties nog eens zien aan artsen, apothekers en andere zorgverleners hoe belangrijk die geneesmiddelinteracties zijn voor de behandeling van patiënten.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we een nieuwe geneesmiddelinteractie van linezolid. Het meten van geneesmiddelconcentraties ten behoeve van TDM is een standaard onderdeel van de zorg die we verlenen aan MDR-TB patiënten binnen het Universitair Medisch Centrum Groningen, Centrum voor Revalidatie / Tuberculose Centrum Beatrixoord (Haren, Nederland; hierna: Tuberculose Centrum Beatrixoord). Tijdens een dergelijke routine-analyse bij een 42-jarige mannelijke tuberculosepatiënt ontdekten we bij toeval een geneesmiddelinteractie tussen linezolid en claritromycine. Bij deze patiënt bleek de blootstelling aan linezolid, weergegeven als de oppervlakte onder de concentratie-tijd curve (AUC) per 12 uur, verhoogd van 29 mg*h/L naar 108 mg*h/L. We konden het verschil niet verklaren met behulp van bekende geneesmiddelinteracties. Ook boden leverproeven en nierfunctietesten geen aanknopingspunt om de verhoogde blootstelling te kunnen verklaren. Het ontstaan van de verhoogde blootstelling aan linezolid viel samen met het toevoegen van claritromycine in een dosering van eenmaal daags 1000 mg aan de behandeling. Op basis van het bovenstaande ontwikkelden we de hypothese dat er mogelijk een interactie zou kunnen zijn tussen linezolid en claritromycine.

Dit heeft ons doen besluiten een open-label, prospectief, één arm, vaste volgorde onderzoek uit te voeren. Het doel van dit onderzoek was om een eventuele farmacokinetische interactie tussen linezolid en claritromycine in maat en getal weer te geven. Zowel volwassen mannen



als vrouwen, bij wie MDR-TB was vastgesteld, kwamen in aanmerking voor deelname aan dit onderzoek. Zwangeren, patiënten die borstvoeding gaven, patiënten met eerder aangetoonde overgevoeligheid voor linezolid of een van de geneesmiddelen uit de claritromycine geneesmiddelgroep, patiënten met een kaliumtekort en patiënten die tegelijkertijd een geneesmiddel toegediend kregen dat de werking van het P-glycoproteïne beïnvloedde, kwamen niet in aanmerking voor deelname aan het onderzoek. Alle deelnemende patiënten kregen gedurende het gehele onderzoek tweemaal daags 300 mg linezolid toegediend. Bij alle patiënten werd de blootstelling gemeten op drie momenten gedurende het onderzoek: 1. wanneer de patiënt alleen linezolid kreeg zonder claritromycine, 2. nadat dezelfde patiënt gedurende twee weken linezolid had ontvangen met eenmaal daags 250 mg claritromycine en 3. nadat deze gedurende twee weken linezolid had ontvangen met eenmaal daags 500 mg claritromycine.

Er hebben zeven patiënten deelgenomen aan het onderzoek en van vijf van deze patiënten konden we de gegevens gebruiken voor de uiteindelijke analyse. Van tevoren hadden we berekend dat dit aantal patiënten voldoende groot was om tot een duidelijk antwoord te komen.

De mediane blootstelling aan linezolid was 36,3 (33,2 – 46,3) mg*h/L zonder gelijktijdige toediening met claritromycine. Na gelijktijdige toediening met eenmaal daags 250 mg claritromycine bleek de mediane (interkwartielbereik, IQR) blootstelling aan linezolid verhoogd tot 61,0 (34,6 – 63,9) mg*h/L ($p=0,686$) en na gelijktijdige toediening met 500 mg claritromycine tot 67,2 (66,9 – 76,0) mg*h/L ($p=0,043$). Met andere woorden: na toevoegen van eenmaal daags 500 mg claritromycine is de blootstelling aan linezolid met een mediaan (IQR) van 44% (23 – 102%) verhoogd ten opzichte van toediening zonder claritromycine. Toediening van 250 mg claritromycine had geen statistisch significant effect op de blootstelling van linezolid.

Het gelijktijdig toedienen van claritromycine en linezolid kon door de meeste patiënten goed verdragen worden. Tijdens het onderzoek zijn geen ernstige bijwerkingen opgetreden. Bij één van de patiënten is een milde tot matig-ernstige (Groep 2, *Common Toxicity Criteria*, CTC) maag-darmbijwerking opgetreden. Op grond van de resultaten uit dit onderzoek concluderen we dat verder onderzoek in een grotere groep van patiënten wenselijk is. Er is vooral behoefte aan inzicht in de oorzaak van het verschil in effectmaat van de waargenomen farmacokinetische interactie tussen de individuele patiënten. Mogelijk was een van de oorzaken verschil in erfelijke aanleg. Tenslotte concluderen we dat TDM van linezolid aan

te raden is indien linezolid tegelijkertijd wordt toegediend met claritromycine totdat het effect van de geobserveerde interactie beter te voorspellen is.

Ondanks het feit dat TDM van linezolid in sommige gevallen aangeraden wordt, is het op klassieke wijze afnemen van verschillende bloedmonsters in de tijd in grote delen van de wereld niet goed uitvoerbaar. Om het afnemen van monsters voor TDM van linezolid te vergemakkelijken, hebben we twee nieuwe methoden ontwikkeld om monsters af te nemen en er vervolgens de waarde van vastgesteld (gevalideerd) in **hoofdstuk 4**. We hebben methoden ontwikkeld om de linezolidconcentratie te kunnen meten in gedroogde druppels bloed op papier (*Dried Blood Spot*, DBS) en in speeksel (*oral fluid*).

Om het meten van linezolid in DBS te valideren, hebben we patiënten uit het Tuberculose Centrum Beatrixoord die linezolid kregen als onderdeel van de MDR-TB behandeling opgenomen in het onderzoek. We hebben bloedmonsters verzameld in de plateau fase (*steady state*) vlak voor inname en 1, 2, 3, 4 en 8 uur na inname van linezolid. Met behulp van deze bloedmonsters hebben we 'veneuze DBS' (vDBS) monsters gemaakt door 50 µL aderlijk bloed te druppelen op geschikt Whatman 31 ET CHR DBS-papier. Ook hebben we DBS-monsters van patiënten verzameld op 2 en 8 uur na het toedienen van linezolid door een druppel bloed uit een vingerprik direct op DBS-papier te laten vallen. In beide gevallen hebben we de bloeddruppels laten drogen bij kamertemperatuur en opgeslagen in een afsluitbare plastic zak met droogpoeder. Hierna zijn de monsters in de vriezer bij -20°C bewaard totdat de monsters geanalyseerd werden. Vlak voor het analyseren hebben we een schijf met een diameter van 8 mm uit het papier met de gedroogde bloeddruppel geboord. Vervolgens hebben we de monsters onderzocht met behulp van een gevalideerde vloeistofchromatografie tandem massaspectrometrische (LC-MS/MS) methode. We hebben de nieuwe DBS-methode gevalideerd in overeenstemming met regelgeving van de Amerikaanse *Food and Drug Administration (FDA)*. Naast het validatie-onderzoek op basis van deze regelgeving, zijn enkele aanvullende onderzoeken uitgevoerd specifiek voor DBS-analyse.

Bij DBS wordt een ingedroogd bloedmonster in een schijfje filterpapier opnieuw in oplossing gebracht zodat een geneesmiddelconcentratie wordt gemeten. De hoeveelheid vloeistof wordt via een standaardmethode toegevoegd, waarbij wordt aangenomen dat bij iedereen de concentratie bloedcellen en hemoglobine (Hb) hetzelfde is. Sommige mensen hebben echter bloedarmoede, anderen hebben juist een hoog Hb. De hoogte van het Hb, die recht evenredig is met de hematocrietwaarde, heeft invloed op de geneesmiddelconcentratie. Ook de grootte

van de bloeddruppels heeft invloed op de met DBS gemeten concentratie. Beide parameters zouden de resultaten van de DBS-analyse kunnen beïnvloeden. We hebben daarom de invloed van een hematocriet van 20, 25, 30, 35, 40, 45 en 50% en bloeddruppelvolumes van 30, 50 70 en 90 μL onderzocht. Voor de validatie hebben we de hematocrietwaarde op 35% en het bloeddruppelvolume op 50 μL ingesteld.

De DBS-analyseresultaten waren recht evenredig met gemeten bloedwaarden over het bereik van de gehele analytische concentratie van 0,05 – 30 mg/L linezolid met een gepoolde correlatiecoëfficiënt van $r^2 = 0,9947$. De reproduceerbaarheid was goed met een systematische fout (*bias*) en variatiecoëfficiënt (CV) kleiner dan 17,2% voor de laagst gevalideerde concentratie (0,05 mg/L linezolid). Voor de andere concentraties (0,25 – 30 mg/L linezolid) waren de waardes van de bias en CV kleiner dan 7,8%. Het effect van verschillen in hematocriet en bloeddruppelvolume was acceptabel. De methode heeft een goede *recovery* van ongeveer 95%. Er is een klein matrixeffect van minder dan 8,7% gemeten. De DBS-monsters bleken stabiel te zijn nadat deze gedurende twee maanden bewaard waren bij 37°C. Een Bland-Altman-analyse liet zien dat de ratio van de linezolidconcentratie in DBS / plasma 1,2 was (95% betrouwbaarheidsinterval, 1,12 – 1,27). Deze correctiefactor moet gebruikt worden om de concentratie gemeten in DBS om te rekenen naar de plasmaconcentratie van linezolid.

We concluderen dat de DBS-analyse van linezolid een gemakkelijke, bruikbare methode is om TDM van linezolid bij MDR-TB uit te voeren. De relatief simpele monsternamprocedure en de grote chemische stabiliteit van de monsters maken de analyse zeer gebruiksvriendelijk. Dit maakt de methode onder andere zeer geschikt voor ontwikkelingslanden.

Tevens hebben we een speekselmonsteranalyse ontwikkeld en gevalideerd (**hoofdstuk 4**). Hiertoe hebben we gegevens van de patiënten gebruikt die deelnamen aan het onderzoek in hoofdstuk 3. Zoals in hoofdstuk 3 beschreven, kregen alle patiënten gedurende twee weken tweemaal daags 300 mg linezolid en eenmaal daags 250 mg claritromycine toegediend. Bloed- en speekselmonsters werden tegelijk afgenomen in de plateau fase. Monsters werden vlak voor toediening van de medicatie verzameld en op 1, 2, 3, 4, 8 en 12 uur na het toedienen van de medicatie. Speeksel werd verzameld met behulp van Salivettes (Sarstedt, Leicester, Engeland). Patiënten kauwden gedurende twee minuten op het katoenen watje van de Salivette. Vervolgens werden de monsters gecentrifugeerd en opgeslagen bij -20°C tot het moment van analyse. Linezolid en claritromycine concentraties zijn vervolgens gemeten met behulp van de door ons gevalideerde LC-MS/MS methode.

Passing-Bablok regressie en Bland-Altman analyse hebben aangetoond dat analyse van linezolid in speeksel een geschikt alternatief is voor conventionele bloedmonsters van patiënten met MDR-TB. Er is geen correctiefactor nodig voor de interpretatie van speekselmonsters, aangezien de ratio tussen de linezolidconcentratie in serum en de concentratie in speeksel met behulp van Bland-Altman analyse berekend is op 0,97 (95% betrouwbaarheidsinterval: 0,92 – 1,02). De Bland-Altman analyse van de claritromycineconcentratie liet echter een ratio tussen serum en speeksel zien van 3,07 (95% betrouwbaarheidsinterval: 2,45 – 3,69). We hebben een niet recht evenredige relatie waargenomen tussen de concentraties van het metabool product hydroxyclearitromycine (in de lever gevormd omzettingsproduct van claritromycine) in serum en speeksel. We concluderen dat de analyse van linezolid en claritromycine in speeksel een makkelijke, non-invasieve methode is om monsters te verzamelen bij MDR-TB patiënten. Dit alternatief zou vooral kunnen worden overwogen wanneer het gebruikelijke verzamelen van bloedmonsters niet mogelijk of wenselijk is.

De mogelijke rol van TDM van linezolid bij MDR-TB bespraken wij in de eerdere hoofdstukken. Anderen hebben gewezen op verschillen in farmacokinetiek van linezolid tussen verschillende patiënten en in één patiënt in loop van de tijd. Het afnemen en analyseren van bloedmonsters ten behoeve van TDM wordt helaas niet altijd bij geneesmiddelenonderzoeken uitgevoerd. Om het belang te onderstrepen dat we hieraan hechten, hebben we een tweetal brieven ingestuurd naar wetenschappelijke tijdschriften in reactie op een tweetal publicaties waarbij geen TDM was uitgevoerd (**hoofdstuk 5**). Naast het belang van TDM hebben we ook getracht aandacht te vestigen op het belang van het innemen van tuberculosemedicatie onder toezicht van zorgprofessionals (*directly observed therapy*, DOT). Alleen bij hoge uitzondering, wanneer therapietrouw hoogstwaarschijnlijk is, zou overwogen kunnen worden om van dit principe af te wijken. Tenslotte hebben we aangegeven dat er grote behoefte is aan het ontwerpen en uitvoeren van een dubbelblind gerandomiseerd onderzoek – een onderzoek waarbij noch de patiënt noch de dokter weet of de patiënt linezolid of een placebo krijgt – bovenop een standaard behandeling. Hierbij is het van belang om ook farmacokinetische gegevens en gegevens over de gevoeligheid van de betrokken bacterie voor de gekozen antibiotica te verzamelen.

De aanbevelingen die we deden in de twee ingestuurde brieven, hebben ons aangespoord om zelf ook het nut van TDM te bestuderen bij onze eigen patiënten die eerder linezolid hadden gebruikt. We hebben de veiligheid en verdraagbaarheid onderzocht in samenhang met de farmacokinetische en farmacodynamische gegevens die we terug hebben gezocht. Om de steekproef te vergroten hebben we niet alleen patiënten geïncludeerd uit het Tuberculose

Centrum Beatrixoord, maar ook uit het E. Morelli Ziekenhuis (Sondalo, Italië). We hebben patiënten geselecteerd die linezolid toegediend kregen als onderdeel van behandeling van MDR-TB. Patiënten jonger dan 18 jaar oud, patiënten waarvan onvoldoende gegevens beschikbaar waren door recente opname in een van beide ziekenhuizen en patiënten waarbij geen bloedmonsters zijn afgenomen voor TDM van linezolid, kwamen niet in aanmerking voor het onderzoek. Twee onderzoekers, één in Italië en één in Nederland, hebben van de geselecteerde patiënten alle belangrijke gegevens verzameld, met in elk geval ook de farmacokinetische gegevens en de behandelresultaten, waarbij we ervoor gezorgd hebben dat de privacy van patiënten niet werd geschonden.

In totaal konden we gegevens van 58 MDR-TB patiënten uit beide centra gebruiken. Van 36 van de 54 patiënten uit Italië waren de gegevens onvolledig. Zo waren er bij 27 van de 36 geen bloedmonsters afgenomen ten behoeve van TDM van linezolid. De mediane (IQR) minimale groeiremmende concentratie (MIC) van de bacteriën voor linezolid was 0,5 (0,25 – 0,5) mg/L. Terugkijkend bleek dat 50% (29/58) van de patiënten genezen was. Op het moment van het verzamelen van de gegevens had 6,9% (4/58) van de patiënten de behandeling afgerond, maar 43,1% (25/58) was nog bezig met de behandeling. Op één patiënt na waren alle patiënten kweeknegatief ('geen groei') op het moment van verzamelen van de data. We hebben in dit cohort geen samenhang kunnen ontdekken tussen omslag in de sputumkweek en PK/PD parameters. Mogelijk speelt het feit dat de AUC/MIC ratio in bijna alle patiënten boven het beoogde doel was een rol.

Terugkijkend zagen we dat patiënten met de bijwerking/vergiftiging perifere neuropathie een hogere mediane (IQR) totale linezolid dosering hadden gekregen. Zo kregen patiënten met perifere neuropathie 1829 (1414 – 2255) mg/kg ten opzichte van 1164 (755 – 1922) mg/kg bij de patiënten zonder perifere neuropathie ($p=0,041$). Ook kregen de patiënten met perifere neuropathie gedurende een langere mediane (IQR) periode linezolid toegediend (159 (120 – 196) dagen) ten opzichte van patiënten zonder perifere neuropathie (97 (66 – 147) dagen) ($p=0,003$). Een andere interessante bevinding uit dit onderzoek was dat het toevoegen van erythropoïetine ("epo" voor het aanmaken van rode bloedcellen) aan behandelingschema's met linezolid om bloedarmoede voorkomen, geen toegevoegde waarde bleek te hebben bij het voorkomen daarvan. We hebben daarvoor het Hb op dag 0, 30, 60 en 90 na starten van linezolid onderzocht. Er was geen verschil tussen het Hb van patiënten die wel of geen erythropoïetine toegediend kregen. Er was er ook geen verschil waar te nemen tussen het Hb in de tijd tussen deze twee groepen.

Terugkijkend leken de behandelregimes met linezolid effectief en waren er niet veel problemen met bijwerkingen. We zagen dat de sputumkweken van de meeste patiënten negatief werden en dat de bijwerkingen heel beperkt waren.

Farmacodynamiek van linezolid

In **hoofdstuk 6** beschrijven we een farmacodynamische interactie tussen linezolid en claritromycine in tuberculosebacteriën. Bij dit onderzoek hebben we samengewerkt met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM, Bilthoven, Nederland) bij het uitvoeren van een laboratoriumtest. We hebben de zogeheten schaakbord methode gebruikt om eventuele synergie (versterkend effect: 2 plus 2 = 5) of juist antagonisme (verzwakkend effect: 2 plus 2 = 3) tussen linezolid en claritromycine te onderzoeken. We hebben hiertoe willekeurig 24 tuberkelbacil stammen geselecteerd uit de biobank van het RIVM bestaande uit bij patiënten geïsoleerde stammen. We gebruikten een tweetal al ontwikkelde methoden om groei/groeiremming vast te stellen, namelijk de absolute concentratie methode (ACM) en de *Mycobacterium Growth Inhibition Tube* (MGIT) 960 methode. Hierbij hebben we groei/groeiremming onderzocht na toevoeging van verschillende concentraties van beide geneesmiddelen op een schaakbord-achtige wijze. Linezolid hebben we toegevoegd in concentraties van 0 – 0,5 mg/L en claritromycine in concentraties van 0 – 8 mg/L. Nadat groei/groeiremming geanalyseerd was bij alle mogelijke combinaties van concentraties van beide geneesmiddelen met de twee methoden hebben we de laagste fractionele groeiemmende concentratie (FIC) berekend. De FIC werd als volgt berekend: MIC van linezolid in combinatie met claritromycine gedeeld door de MIC van linezolid zonder claritromycine plus de MIC van claritromycine in combinatie met linezolid gedeeld door de MIC van claritromycine zonder linezolid. Synergie was gedefinieerd als een $FIC \leq 0,5$, geen invloed (*indifference*) als een $0,5 < FIC \leq 4$ en antagonisme als een $FIC > 4$.

In 74% van de 24 willekeurig geselecteerde tuberculosebacteriën bleek er synergie te zijn tussen claritromycine en linezolid wanneer de MGIT methode gebruikt werd. Wanneer de ACM methode gebruikt werd was dit percentage 59%. Er werd in geen van de geselecteerde bacteriën antagonisme gezien. Aangezien de combinatie van linezolid en claritromycine in de praktijk vooral bij MDR-TB patiënten wordt toegepast, hebben we extra aandacht besteed aan de selecteerde bacteriën van MDR-TB patiënten. In deze MDR-TB bacteriën (n=13) bleek synergie te zijn in 77% van de gevallen gemeten met de MGIT methode en in 46% van de gevallen gemeten met de ACM methode. Ook hier werd in geen van de gevallen antagonisme

waargenomen. De mediane (IQR) FIC die berekend werd bij de MDR-TB patiënten was 0,37 (0,32 – 0,37) en 0,62 (0,375 – 1,0). We concluderen dan ook dat claritromycine en linezolid synergetisch werken in een deel van de laboratoriumtesten met MDR-TB bacteriën. Dit kan misschien helpen bij het ontwerpen van toekomstige MDR-TB behandelingschema's.

In **hoofdstuk 7** bespreken we de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift: wat voegt het toe aan wat we al wisten, en hoe kunnen we de resultaten gebruiken voor patiënten met MDR-TB? We bespreken het belang van farmacokinetische geneesmiddelinteracties met antibiotica als *slachtoffer*, maar ook als *veroorzaker* van de interactie. Hiernaast besteden we aandacht aan het belang van geïndividualiseerde behandelingschema's en de noodzaak om PK/PD streefwaarden voor TDM te onderzoeken. Tenslotte gaan we op het toekomstperspectief in: 1. Waar verwachten we dat de behandeling van MDR-TB naar toe zal gaan in de komende jaren; 2. Welke rol zou linezolid kunnen spelen bij de behandeling van (multiresistente) tuberculose; 3. Wat zou in de komende jaren de impact kunnen zijn van het verlopen van het patent van linezolid en 4. Wat zou (vervolg)onderzoek kunnen zijn waaraan op dit moment het meeste behoefte is.



**Co-authors of manuscripts
presented in this thesis**

Affiliations during the conductance of the research

J.W.C. Alffenaar University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy (before 2014), Department of Clinical Pharmacy and Pharmacology (since 2014), Groningen, the Netherlands.

R. van Altena University of Groningen, University Medical Center Groningen, Tuberculosis Center Beatrixoord, Haren, the Netherlands.

J.R.B.J. Brouwers University of Groningen, Department of Pharmacotherapy and Pharmaceutical Care, Groningen, the Netherlands.

S. De Lorenzo E. Morelli Hospital AOVV, Reference center for MDR-TB and HIV-TB, Sondalo, Italy.

B. Greijdanus University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy, Groningen, the Netherlands

K. van Hateren University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy, Groningen, the Netherlands

R.A. Koster University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy, Groningen, the Netherlands.

J.G.W. Kosterink University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy (before 2014), Department of Clinical Pharmacy and Pharmacology (since 2014), Groningen, The Netherlands and University of Groningen, Department of Pharmacy, Section Pharmacotherapy and Pharmaceutical Care, Groningen, the Netherlands.

T. van der Laan National Tuberculosis Reference Laboratory, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands.

W.C.M. de Lange University of Groningen, University Medical Center Groningen, Tuberculosis Center Beatrixoord, Haren, the Netherlands.

G.B. Migliori WHO Collaborating Centre for Tuberculosis and Lung Diseases, Fondazione S Maugeri, Care and Research Institute, Tradate, Italy.

P.N. Panday University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy, Groningen, the Netherlands.

A.D. Pranger University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy, Groningen, the Netherlands.

D. van Soolingen National Tuberculosis Reference Laboratory, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands and Radboud University Nijmegen Medical Center, Departments of Clinical Infection Diseases and Pulmonary Diseases and Medical Microbiology, Nijmegen, the Netherlands.

G. Sotgiu Clinical Epidemiology and Medical Statistics Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Research, Medical Education and Professional Development Unit, AOU Sassari, Italy.

S. Tiberi Imperial College Healthcare NHS Trust, London, UK.

D.R.A. Uges University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy, Groningen, the Netherlands.

D.H. Vu University of Groningen, Department of Pharmacotherapy and Pharmaceutical Care, Groningen, the Netherlands; University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Hospital and Clinical Pharmacy, Groningen, the Netherlands and Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam.

T.S. van der Werf University of Groningen, University Medical Center Groningen, Departments of Internal Medicine, and Pulmonary Diseases & Tuberculosis, Groningen, The Netherlands and University of Groningen, University Medical Center Groningen, Tuberculosis Center Beatrixoord, Haren, the Netherlands.



Dankwoord

Het slotakkoord! Naast het feit dat onderzoek doen vooral leuk is, is het ook erg fijn om iets – al is het maar een klein beetje – bij te kunnen dragen aan de behandeling van de tuberculose. Zonder hulp van velen had ik dit punt nooit bereikt. Allereerst wil ik de patiënten, die zonder eigenbelang deelnamen aan het onderzoek, hartelijk bedanken.

Ik ben vooral mijn promotores en copromotor ontzettend dankbaar.

Prof. dr. T.S. van der Werf, beste Tjip. Ik heb ontzettend veel bewondering voor jou als arts, promotor en onderzoeker. Hartelijke dank voor je kritische blik op alle geschreven stukken. Vooral bij de eerste manuscripten had je veel op te merken ('de METc maakte meer spelfouten dan jij' en 'kleine suggesties mijnerzijds'). Zonder je tekstuele, maar vooral ook inhoudelijke input zou het proefschrift nooit deze staat bereikt hebben. In het begin moest ik soms wat wennen aan je directe manier van communiceren. Maar ik kan me herinneren dat we elkaar tegenkwamen in een gang in het UMCG en dat je, zonder iets te zeggen, je hand opstak waarna we elkaar zwijgend een *high five* gaven. Toen wist ik dat de samenwerking goed zou komen. Ook heb ik erg veel gehad aan het samen peer-reviewen. Dit heeft geholpen bij het gestructureerd inhoudelijk en methodologisch kijken naar onderzoeken en kritisch kijken naar de nieuws waarde. Tenslotte wil ik je graag hartelijk bedanken voor de benodigde uitleg en bovenal humor tijdens de TB-visites.

Prof. dr. J.G.W. Kosterink, beste Jos. Jij was niet alleen promotor, maar ook nog eens opleider tijdens een deel van dit promotietraject. Ik heb altijd ontzettend veel bewondering gehad voor het feit dat je je drukke baan als hoofd van de afdeling Klinische Farmacie en Apotheek – sinds januari 2014 Klinische Farmacie en Farmacologie – combineert met het opleiden van ziekenhuisapothekers, klinisch farmacologen, farmaciestudenten en promovendi. Toch was je altijd beschikbaar voor promotiebesprekingen, inhoudelijk overleg over op te zetten onderzoek, het reviseren van manuscripten, maar ook voor *ad hoc* overleg wanneer ik dat nodig had. Hartelijk dank daarvoor! Tenslotte wil ik je – ook hier nog eens – hartelijk danken voor het opleiden tot ziekenhuisapotheker. Ik heb ontzettend veel geleerd.

Prof. dr. D.R.A. Uges, beste Donald. Zowel voor als tijdens je emeritaat speelde je een grote rol bij het onderzoek. Geweldig dat je nu nog steeds tijd vrij maakt voor het onderzoek. Niet alleen op afstand door het reviseren van stukken tekst, maar ook nu zit je altijd trouw bij de promotiebesprekingen. Dit geeft wel aan dat je een promotor in hart en nieren bent. In de eerste fase van het promotieonderzoek zat ik deels op het laboratorium als ziekenhuisapotheker in opleiding. Zonder een goed draaiend laboratorium, waar je het onderzoek altijd een belangrijke plaats gaf, had dit proefschrift nooit zijn huidige staat

bereikt. Ook denk ik met veel dank terug aan de eerste periode als projectapotheker en later als ziekenhuisapotheker op het laboratorium waar je me altijd bij alle interessante cases betrok. Hier is misschien wel de basis gelegd voor mijn interesse in PK/PD en überhaupt in onderzoek.

Dr. J.W.C. Alffenaar, beste Jan-Willem. Ik heb er ontzettend veel bewondering voor hoe je binnen korte tijd na het afronden van je eigen promotie als co-promotor verschillende promovendi met succes begeleidt, een goed (inter)nationaal netwerk op hebt gebouwd en overal mogelijkheden ziet. Je ziet overal kansen en mogelijkheden. Een mooie eigenschap bij het opzetten van onderzoek. Ik wil je bedanken voor alle inhoudelijke gesprekken over het onderzoek en het mij betrekken bij verschillende ideeën en vooral voor het vertrouwen dat je in me had. Na het opschrijven van het case-report, ontstond bijna vanzelfsprekend de mogelijkheid om hier een promotieonderzoek van te maken, wat ik met beide handen aangreep.

Graag zou ik de beoordelingscommissie, bestaande uit prof. dr. D.M. Burger, prof. dr. F.G.J. Cobelens en prof. dr. G. M. M. Groothuis, willen bedanken voor het beoordelen van het manuscript.

Er zijn veel mensen die een grote rol hebben gespeeld bij het totstandkomen van dit proefschrift. Ik zou dan ook allen willen bedanken die een directe bijdrage hebben geleverd aan de inhoud van dit proefschrift.

Allereerst de artsen van de TB-afdeling: drs. O.W. Akkerman, drs. R. van Altena en drs. W.C.M. de Lange. Zonder jullie hulp bij het opzetten van het onderzoek, bij het verzamelen van monsters en bij de inclusie van patiënten, was dit onderzoek nooit tot stand gekomen. We zeggen soms gekscherend dat alle tuberculosepatiënten op de locatie Beatrixoord op enig moment in een onderzoek terecht komen. Hoewel dat natuurlijk niet helemaal waar is, geeft dit wat mij betreft wel jullie onderzoeks-mindedness aan. Verder wil ik jullie, maar ook zeker dr. Y (Ymkje) Stienstra en Tjip, hartelijk danken voor de TB-visites. Dank voor het feit dat jullie mij als simpele apotheker meegenomen hebben in de wereld van de patiënt en de behandelaar, maar ook dank voor de humor tijdens deze besprekingen. Beste Onno, geweldig om met jou op OK monsters te verzamelen bij een wervel-TB operatie. Succes met het afronden van jouw boekje! Beste Richard, hartelijke dank, succes met je proefschrift en geniet van Myanmar. Wie weet ben ik ooit eens in de buurt. Beste Wiel, dank voor het mij op sleeptouw nemen bij de GGD en de mooie verhalen tijdens de visites.

Ook zijn er enkele apothekers die een directe, inhoudelijk bijdrage hebben geleverd aan dit proefschrift: drs. P.V. Nannan Panday, drs. A.D. Pranger en dr. D.H. Vu. Beste Prashant, hartelijk dank voor alle supervisie tijdens mijn opleiding tot ziekenhuisapotheker. Je hebt als consulent infectieziekten ontzettend veel kennis en expertise opgebouwd over medicamenteuze behandeling van infecties welke zeer van pas kwamen bij het opstellen van onze review naar geneesmiddelinteracties van antibiotica. Hiernaast waardeer ik je ook vooral als directe collega. Beste Arianna, vooral bij het prospectieve onderzoek heb je, met de ervaring die jij reeds had, me veel geholpen. Hiernaast denk ik met veel plezier terug aan de baseballwedstrijd die we samen keken: *Let's go Giants!* Dear Hoa, I really enjoyed our cooperation on the analytical studies such as the linezolid in DBS study.

Hiernaast zijn er twee laboratoria geweest die dit onderzoek mogelijk gemaakt hebben. Beide spelen niet alleen bij het onderzoek, maar ook bij de routinezorg een zeer grote rol voor de tuberculose. Allereerst dank aan alle analisten van het laboratorium van de ziekenhuisapotheek van het UMCG. Iedereen is wel op enig moment betrokken geweest bij het onderzoek. B. Greijdanus, beste Ben; R.A. Koster (binnenkort dr. Koster!), beste Remco; K. van Hateren, beste Kay. Hartelijke dank voor het bijdragen van jullie analytische expertise aan enkele van de artikelen in dit proefschrift. Hiernaast wil ik ook bioanalyse-analisten, Albert-Jan, Erwin, Gerben, Hiltjo, Jan, en Mireille bedanken voor hun inzet: *merci!*

Het laboratorium van het RIVM speelde een belangrijke rol bij het uitvoeren van *drug susceptibility* testen, maar ook bij enkele onderzoeken. Prof. dr. D. van Soolingen, beste Dick en T. van der Laan, beste Tridia. Bedankt voor de prettige samenwerking.

I would like to thank the co-authors that contributed to the work in this thesis: Prof. dr. J.R.B.J. Brouwers (dank!), Simon Tiberi, Giovanni Sotgiu, Saverio De Lorenzo, Giovanni Battista Migliori. *Mille Grazie!* I hope we're able to continue our international collaboration. Working together is the way forward.

Ook zou ik graag de verpleging van het Tuberculose Centrum Beatrixoord willen bedanken voor de rol die ze hebben gespeeld in dit onderzoek. Voor dit type onderzoek is het toedienen van het juiste geneesmiddel op het juiste moment van groot belang. Het is dan ook erg fijn dat jullie dit met zijn allen inzien en hier zo goed mee om gaan. Ook denk ik met plezier terug aan de scholingsmomenten gerelateerd aan het onderzoek, waarbij jullie zelfs bij elkaar DBS monsters afnamen.

Hiernaast ben ik het secretariaat van de apotheek erg dankbaar voor de hulp die ze altijd bieden. Specifiek voor het onderzoek door middel van het versturen van brieven naar de METc en andere instanties en het inplannen van afspraken met mede-onderzoekers, maar ook in het algemeen in deze laatste fase van het onderzoek en tijdens het alledaagse werk in het UMCG. Annemiek, Jessica en Wianda: dank jullie wel!

Verder ben ik alle apothekersassistenten erg dankbaar voor de ondersteuning bij het onderzoek. Vooral dank aan de collega's van de KGO, de balie, het magazijn, de voorraadbereidingen en satellietapotheek Beatrixoord. Jullie hulp maakte dat dit onderzoek te combineren was met andere taken binnen de apotheek.

Tenslotte ben ik de staf, (ziekenhuis)apothekers en oud-collegae van de voormalige afdeling Klinische Farmacie en Apotheek erg dankbaar voor de feedback en de discussies: Anet, Annelies, Barbara, Bart, Bob, Daan, Derk, Eli, Esther, Eva, Frank-Jan, Gea, Hèlen, Hendrikus, Hilma, Iemke, Jan, Joke, Kim, Lisanne, Marian, Marieke, Marina, Marijn, Marjolijn, Marjolijn, Matthijs, Minke, Nour, Reinout Susan, Sylvia en Trea. Dank voor alles! Ik ben blij met jullie als collega's. Ook hartelijk dank aan alle nieuwe collega's van de voormalige Klinische Farmacologie van prof. Dick de Zeeuw. Ik verheug me op een intensieve samenwerking in de komende jaren.

Hiernaast zijn er natuurlijk ook velen die indirect hebben bijgedragen aan dit onderzoek. Ik wil daarom al mijn familie en vrienden bedanken voor de mooie tijden!

Ik heb tijdens mijn studietijd met erg veel plezier wedstrijd geroeid bij de A.G.S.R. Gyas. De combinatie van feesten, sociaal leven, met zijn allen trainen voor een doel, nooit opgeven ('pijn is tijdelijk, opgeven is voor eeuwig') heeft bijgedragen aan hoe ik nu ben. Dank aan al mijn Gyas-vrienden en -kennissen, maar vooral aan mijn ploeggenoten, coaches en stuurjtes: Bram, Niels, Thijs, Janneke, Karijn, Alma, Maurice, Jan, Juliette, Nanne, Irma, Koen, Carolien en Sybolt.

Dr. E.A.M. Festen, beste Noortje. Ik bewonder je gedrevenheid, je zelfvertrouwen, je eigenzinnigheid. Je hebt een grote rol gespeeld bij het feit dat ik promotieonderzoek ben gaan doen.

Beste Djoelan, dank voor alle gezelligheid en theetjes op het terras '*Chez Mathieu*' aan de Vismarkt. Je bent een van de meest sociale mensen die ik ken.

Ook zou ik graag iedereen bedanken met wie ik schaats of fiets. Zonder regelmatig sporten zou ik gek worden. Is er iets lekkerder na een dag werken aan je onderzoek dan lekker schaatsen of een ‘rondje Zoutkamp’ doen? Rik en Anton, ik hoop dat we ooit nog een keer de echte Elfstedentocht mogen doen.

Beste Bas, Njord, Robbert, Peter en Tim. Ik ben ontzettend blij dat we elkaar hebben leren kennen via of op het Praedinius. We hebben de afgelopen jaren veel mooie dingen gedaan. Om maar een paar hoogtepunten te noemen: Lowlands, weekendje Boekarest, Pitch festival, maar ook op stand dineren bij ‘In de Molen’. Het plannen is soms lastig met alle volle agenda’s en de verschillende steden, landen, continenten waar we wonen. Het resultaat is echter altijd de moeite waard.

Ik ben blij met iedereen die ik via Mijntje heb leren kennen. Haar hele familie, maar vooral Wil, Ben, Margriet, Jeroen, Maartje en Phillip, en al haar vrienden. Fijn dat Mijntje zulke leuke vriendjes en vriendinnetjes heeft.

Ook zou ik mijn hele familie – alle ooms, tantes, neven, nichten en andere familie – willen bedanken voor de steun en interesse. Lieve opa’s en oma, lieve Anna, Hein en Thies. mede dankzij jullie heb ik zulke mooie jeugdherinneringen. Ik hoop dat ik nog jaren van jullie mag genieten in goede gezondheid.

Ook zou ik mijn paranimfen, Jasper en Wouter, willen bedanken. Ik heb erg veel aan jullie beiden gehad tijdens mijn promotie. Jasper, geweldig dat je enige tijd geleden besloten hebt naar Groningen terug te komen. Hoewel het samen sporten er niet vaak genoeg van komt, hebben de avondjes in de stad, lekker eten met kookclub ‘Mathieu en Jasper’ en het samen rondhangen gezorgd voor de nodig ontspanning. Wie weet komt die marathon er ooit nog van. Wouter, mijn derde ‘broertje’, ik denk met veel plezier terug aan de avondjes Eurosonic, onze gezamenlijke playlist, de BBQ’s bij jullie in de tuin, de echte koffie en onze werklunch bij een welbekend Schots etablissement. Geweldig om met jou te ouwehoeren in de apotheek. Jasper en Wouter, dank voor jullie praktische tips over het promoveren. Het wordt een mooie dag!

Lieve Jaap en Marielou. Bedankt voor alles. Dankzij jullie opvoeding ben ik zo geworden als ik nu ben. Op geen enkel vlak kan ik me een beter voorbeeld dan jullie wensen. Dank voor jullie steun. Lieve Oskar en Jules. Ik ben ontzettend blij met jullie als broers! Dank voor de mooie tripjes, leuke weekenden en de gezelligheid. Jules, dank voor de vakantie naar een van mijn droombestemmingen: Soedan. Het was onvergetelijk! Oskar en Tessa, geweldig dat jullie gaan trouwen! Ik wens jullie het allerbeste.

Allerliefste Niamey, geachte Prop-Joe. Bedankt.

Liefste Mijntje. Wat kan een simpele treinreis toch veel veranderen. Ik ben ontzettend dankbaar dat ik toevallig tegenover jou kwam te zitten. Dank voor je steun en begrip voor het onderzoek. Maar bovenal dank dat de afgelopen jaren met jou zo geweldig waren: mooie feestjes, geweldige reizen (ooit nog Nigeria?), familie opzoeken in Madrid, serietjes kijken op de bank, stedentripjes, lekker koken, dansen door de woonkamer, theater en concertbezoek, samen krantjes lezen en nog veel meer. Ik kan niet wachten op wat de toekomst met jou in petto heeft.



About the author

Curriculum vitae

Mathieu Sander Bolhuis was born on May 11th 1981 in Groningen, the Netherlands. In 1999, he graduated from the Praedinius Gymnasium, a secondary school in Groningen, and started to study Pharmacy at the University of Groningen. In 2005, he obtained his master's degree and in 2007 he graduated as a pharmacist.

From 2004 until 2006, Mathieu was part of a Men's Heavyweight Crew of the student Rowing Club A.G.S.R. Gyas (Groningen, the Netherlands). In 2006, he stayed in Ghana as a part of a Pharmacy internship.

After graduation, Mathieu started working as a pharmacist at the Diaconessenhuis (Leiden, the Netherlands). In 2008, he returned to Groningen to work at the department of Hospital and Clinical Pharmacy at the University Medical Center Groningen (UMCG). Here he worked at the laboratory and as a Clinical Trial Pharmacist.

In December 2008, he started his specialization to become a hospital pharmacist, under supervision of prof.dr. Jos Kosterink. As a part of this specialization, a prospective study was carried out, which turned out to be the beginning of his PhD project. In December 2012, he was registered as a hospital pharmacist and he continued working at the UMCG.

At the moment, Mathieu works as a hospital pharmacist at the department of Clinical Pharmacy and Pharmacology of the UMCG where he is responsible for the pharmaceutical care of the Center for Rehabilitation / Tuberculosis Center Beatrixoord (Haren, the Netherlands). In addition, he works on a project aiming to implement a new electronic patient database for the UMCG and started with a training to become a clinical pharmacologist.

Mathieu lives together with his girlfriend Mijntje ten Brummelaar and their two cats, Niamey (2011) and Prop-Joe (2011). He enjoys travelling, cycling and West-African music from the seventies. One day he hopes to ride and finish the Elfstedentocht.

List of publications related to this thesis

Bolhuis, M. S., T. van der Laan, J. G. Kosterink, T. S. van der Werf, D. van Soolingen, and J. W. Alffenaar. 2014. In vitro synergy between linezolid and clarithromycin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. Respir. J.* **44**:808-811.

Bolhuis, M. S., R. van Altena, D. van Soolingen, W. C. Lange, D. R. Uges, T. S. van der Werf, J. G. Kosterink, and J. W. Alffenaar. 2013. Clarithromycin increases linezolid exposure in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Eur. Respir. J.* **42**:1614-1621.

Bolhuis, M. S., R. van Altena, K. van Hateren, W. C. de Lange, B. Greijdanus, D. R. Uges, J. G. Kosterink, T. S. van der Werf, and J. W. Alffenaar. 2013. Clinical validation of the analysis of linezolid and clarithromycin in oral fluid of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:3676-3680.

Bolhuis, M. S., A. D. Pranger, and J. W. Alffenaar. 2012. Linezolid: safety and efficacy monitoring. *Eur. Respir. J.* **39**:1275-1276; author reply 1276-1277.

Bolhuis, M. S., R. van Altena, and J. W. Alffenaar. 2012. Comment on: daily 300 mg dose of linezolid for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: updated analysis of 51 patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:2055-6; author reply 2056-2057.

Vu, D. H., M. S. Bolhuis, R. A. Koster, B. Greijdanus, W. C. de Lange, R. van Altena, J. R. Brouwers, D. R. Uges, and J. W. Alffenaar. 2012. Dried blood spot analysis for therapeutic drug monitoring of linezolid in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:5758-5763.

Bolhuis, M. S., P. N. Panday, A. D. Pranger, J. G. Kosterink, and J. W. Alffenaar. 2011. Pharmacokinetic drug interactions of antimicrobial drugs: a systematic review on oxazolidinones, rifamycines, macrolides, fluoroquinolones, and Beta-lactams. *Pharmaceutics.* **3**:865-913.

Bolhuis, M. S., R. van Altena, D. R. Uges, T. S. van der Werf, J. G. Kosterink, and J. W. Alffenaar. 2010. Clarithromycin significantly increases linezolid serum concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5418-5419.

Other publications

Sturkenboom, M. G., O. W. Akkerman, M. S. Bolhuis, W. C. de Lange, T. S. van der Werf, and J. W. Alffenaar. 2014. Adequate design of pharmacokinetic - pharmacodynamic studies will help optimize TB treatment for the future. *Antimicrob. Agents Chemother.* Accepted (AAC05173-14).

Hofman, S., M.S. Bolhuis, R.A. Koster, O.W. Akkerman, C. Stove, and J.W. Alffenaar. 2014. Dried blood spots to support treatment of pulmonary infections. *Bioanalysis.* Accepted.

Vu, D. H., R. A. Koster, M. S. Bolhuis, B. Greijdanus, R. van Altena, D. H. Nguyen, J. R. Brouwers, D. R. Uges, and J. W. Alffenaar. 2014. Simultaneous determination of rifampicin, clarithromycin and their metabolites in dried blood spots using LC-MS/MS. *Talanta.* **121**:9-17.

Akkerman, O. W., R. van Altena, M. S. Bolhuis, T. S. van der Werf, and J. W. Alffenaar. 2014. Strategy to limit sampling of antituberculosis drugs instead of determining concentrations at two hours postingestion in relation to treatment response. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:628-13.

De Lorenzo, S., J. W. Alffenaar, G. Sotgiu, R. Centis, L. D'Ambrosio, S. Tiberi, M. S. Bolhuis, R. van Altena, P. Viggiani, A. Piana, A. Spanevello, and G. B. Migliori. 2012. Efficacy and safety of meropenem/clavunate added to linezolid containing regimens in the treatment of M/XDR-TB. *Eur. Respir. J.* **42**:1386-1392.

Labberton, L., R. E. Herder, M. S. Bolhuis, R. C. Schellekens, and D. R. Uges. 2011. Formulation of a tacrolimus suspension with extended expiry date using raw materials. *EJHP Practice.* **17**:36-40.