



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2020; 34 (2): 69 - 73
http://www.fusabil.org

Burcu KARAGÜLLE ^{1, a}
Mehmet Nuri AÇIK ^{2, b}
Burhan ÇETİNKAYA ^{1, c}

¹ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Bingöl Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Bingöl, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-6628-4515

^b ORCID: 0000-0002-1908-5898

^c ORCID: 0000-0001-6347-1684

Çevresel Örneklerde *Arcobacter butzleri*'ye Spesifik Litik Etkili Fajların Araştırılması *

Bu çalışmada, tavuk kümesleri ve sığır çiftliklerinden toplanan toprak, atık su, altlık, dışkı gibi çevresel örneklerde *Arcobacter butzleri* türüne spesifik fajların varlığı çift tabakalı agar yöntemi kullanılarak araştırıldı. İncelenen 800 saha örneğinin iki tanesinde ilk izolasyonda gözle görülebilir nitelikte faj varlığını gösteren erimeler tespit edildi. Erimelerin olduğu agar kısmının her biri bistüri ile kesilerek Tryptic Soya Broth besi yerlerine aktarıldı. İzole edilen fajları çoğaltmak amacıyla yapılan daha sonraki birçok analizlerde, başlangıçta erime oluşturan iki fajın erime göstermediği ve plak oluşturmadığı tespit edildi. Aynı analizler farklı kanatlı türlerinden izole edilen yedi *A. butzleri* saha suşunda da denendi. Ancak herhangi pozitif bir sonuç elde edilemedi. Sonuç olarak toplanan çevresel örneklerde *A. butzleri*'ye spesifik litik etkili fajların varlığı ile ilgili önemli ipuçları elde edilmesine rağmen bununla ilgili kesin bir veriye ulaşılamadı. İzole edilen fajların profaj olma ihtimali dikkate alındığında, ileride yapılacak çalışmalarda bu konuya odaklanması gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Arcobacter butzleri*, faj, çevresel örnekler

Investigation of Lytic Phages Specific to *Arcobacter butzleri* in Environmental Samples

In this study, the presence lytic phages specific to *Arcobacter butzleri* was investigated in environmental samples by using double layer agar method. In two of the 800 field samples examined, melts indicating the presence of visible phage were detected at the initial isolation. Each of the agar with melts was cut and transferred to Tryptic Soy Broth broths. In many subsequent analyzes to amplify the isolated phages, it was found that the two initially dissolving phages did not dissolve and did not form plaques. The same assays were tested in seven *A. butzleri* field strains isolated from different poultry species. However, no positive result was obtained. In conclusion, although there were important clues about the presence of lytic-effect phages specific to *A. butzleri* in the collected environmental samples, no definite data could be obtained. Considering the possibility of isolated phages to be prophage, further studies focusing on this subject are required.

Key Words: *Arcobacter butzleri*, phage, environmental samples

Giriş

Arkobakterler, *Kampilobakter* ve *Helikobakter* cinsi bakterilerin de içinde yer aldığı Epsilobacteria grubunun bir üyesidir. Önceleri aerotolerant *Kampilobakter* olarak bilinen Arkobakterler, uluslararası gıda mikrobiyoloji komitesi (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) tarafından insan sağlığını ciddi şekilde tehdit eden gıda orijinli önemli bir patojen olarak değerlendirilmektedir (1). Şu ana kadar 25 *Arkobakter* türü tespit edilmesine rağmen, insan, hayvan ve çevresel örneklerden en sık izole edilen tür *Arcobacter butzleri*'dir. *A. butzleri* sağlıklı insan ve hayvanların bağırsaklarında kommensal olarak bulunabileceği gibi, gastroenteritis, bakteriyemi, abort, mastitis vd. klinik belirtilere de neden olmaktadır (2-5). Arkobakterler çoğunlukla hafif enfeksiyonlara neden oldukları için herhangi bir tedaviye ihtiyaç duyulmadan iyileşmeler görülebilmektedir. Ancak, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden oldukları için bu bakterilerin kontrol altına alınması amacıyla antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisi ve kontrolünde son 20-30 yıldır yoğun bir şekilde antibiyotik kullanımına bağlı olarak bütün dünyada direnç gelişimi rapor edilmektedir (6, 7). Arkobakterler diğer patojen bakterilerin aksine yeni keşfedilen bir bakteri olmasına rağmen yapılan birçok çalışmada bu etkenlerin de piyasadaki birçok antibiyotiğe karşı yüksek oranlarda direnç gösterdikleri bildirilmiştir (8-11). Piyasada mevcut birçok antibakteriyel maddelere karşı gelişen dirençlilik ve buna bağlı olarak enfeksiyöz hastalıkların tedavisi ve kontrolünde yaşanan darboğazlar bilim insanlarını alternatif mücadele yöntemlerine yöneltmiştir. Son yıllarda patojen bakterilere karşı bakteriyofajların kullanıldığı ve "faj terapisi" olarak adlandırılan tedavi yöntemi hızla gelişmektedir. Antibiyotiklerden daha önce keşfedilen fajların, önceleri tedavide kullanılabilmesine yönelik çalışmalar yapılmış olmakla birlikte, antibiyotiklerin keşfinden sonra fajlara olan ilgi azalmıştır. Ancak son yıllarda antibiyotiklere karşı artan direnç,

Geliş Tarihi : 07.03.2020
Kabul Tarihi : 04.04.2020

Yazışma Adresi Correspondence

Burcu KARAGÜLLE
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ – TÜRKİYE

bkaragulle@firat.edu.tr

* Bu proje, TÜBİTAK-TOVAG tarafından 1002 hızlı destek programı kapsamında (TÜBİTAK-118O456) desteklenmiştir.

enfeksiyonların tedavi ve kontrolünde fajların tekrar kullanılmasını gündeme getirmiştir. Bazı ülkelerde faj terapisi rutin olarak tedavide kullanılmasına rağmen piyasada lisanslı bir faj bulunmamaktadır. Antibiyotiklere göre fajların birçok avantajı olsa da, dirençlilik, dar spektrumlu olma ve yarı ömürlerinin kısa olması gibi dezavantajları bunların tedavide kullanılmasını sınırlandırmaktadır (11).

Yapılan literatür taramasında birçok bakteride spesifik fajların varlığı ve tedavide kullanılabilirlikleri ile ilgili araştırmaların yapıldığı ancak *Arkobakter* türlerine spesifik fajların varlığını ortaya koyan bir çalışmanın olmadığı görülmüştür. Bu amaçla yapılan bu çalışmada Bingöl ve çevresindeki mevcut tavuk kümesleri ve sığır çiftliklerinin bulunduğu yerlerden toplanan toprak, atık su, altlık, dışkı gibi çevresel örneklerden *A. butzleri* türüne spesifik litik etkili fajların varlığı araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Bingöl Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından 07.02.2020 tarih, 85680299/020/ sayı ve nolu kararına göre etik kurul onayı almıştır.

Bakteriyofaj İzolasyon Kaynakları: Bingöl ve çevresindeki mevcut tavuk kümesleri ve sığır çiftliklerinin bulunduğu yerler belirli periyotlarla üç kez ziyaret edilerek toprak, altlık, atık su ve dışkı örnekleri toplandı. Toprak, altlık ve dışkı örnekleri steril örnek toplama kaplarına, atık sular ise steril şişelere aktarılarak en kısa sürede aseptik şartlarda ve soğuk zincir altında laboratuvara taşındı. Çalışmada her bir numuneden 200 adet olmak üzere toplam 800 örnek, *A. butzleri*'ye spesifik fajlar yönünden incelendi.

Bakteriyofaj İzolasyonu: Toplanan örneklerden bakteriyofaj izolasyonu için aşağıda açıklanan protokol uygulandı (12, 13).

1. Laboratuvara getirilen atık su örneklerinin her birinden 200 ml alınarak 3600 rpm'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Altlık ve dışkı örnekleri ise 10 g/mL olacak şekilde önce Tryptic Soya Broth (TSB) besi yerinde (Merck 1.054559) ön zenginleştirmeye tabi tutularak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon takiben örnekler 3600 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

2. Elde edilen süpernatant, sırasıyla 0.45 µL ve 0.22 µL'lik steril şırıngalı filtrelerden (Whatman) geçirilerek süzüldü.

3. Süzülen sıvı üzerine 8 mL %50 polietilen glikol (PEG) 8000, 4 mL 5M NaCl ve 1 mL distile su ilave edildi.

4. Hazırlanan karışım 1 dk süreyle vortekslelendikten sonra 24 saat boyunca +4 °C'de bekletildi.

5. Bir gecelik inkübasyonun ardından karışım 5800 rpm'de 90 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki süpernatantlar atılarak tüplerin dibindeki peletler 1 mL steril Tris-EDTA (TE) buffer ile sulandırıldı.

***Arcobacter butzleri* Konakçı Kültürünün Hazırlanması:** Bu çalışmada ATCC (American Type Culture Collection) 49616 *A. butzleri* referans suşu kullanıldı. *A. butzleri* konakçı kültürü için 50 mL'lik falcon tüplere 20'şer mL TSB besi yeri hazırlanarak taksim edildi. Sterilite kontrolü için sıvı besi yerleri bir gece 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonu takiben steril TSB'ye *A. butzleri* bakteri stoğundan 1 mL ilave edilerek 37 °C 250 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası çoğaltılan konak bakteriden 5 mL alınarak yeni bir steril TSB sıvı besi yerine ekim yapıldı. Çalkalamalı etüvde 37 °C'de 4 saat inkübe edildikten sonra konakçı bakteri, faj ile birlikte besi yerine ekilmeye hazır hale getirildi.

Çift Tabakalı Agar Yöntemiyle Bakteriyofaj

Tespiti: Bakteriyofaj plaklarının görüntülenebilmesi için çift tabakalı agar yöntemi kullanıldı. Öncelikle konak bakteri ve şüpheli faj solüsyonunun gömüleceği yumuşak agar hazırlandı. Bu amaçla 100 mL yumuşak agar için; 1 g Tryptone (Lab M), 1 g NaCl (Merck), 1 g Yeast Extract (Biolife) ve 0.6 g agar (Difco-Bacto agar) tartıldı ve 250 µL MgSO₄ ile 150 µL CaCl₂ ilave edilerek kaynatıldı. Hazırlanan agar cam tüplere 3'er mL ilave edilerek otoklavda steril edildi. Yumuşak agar, bakteri kültürü ilave edilene kadar katılaşmaması için 50 °C'de benmaride (Memmert) bekletildi. Ardından yumuşak agarlı tüplerin içerisine 100 µL şüpheli faj solüsyonundan ve 100 µL'de bakteri süspansiyonundan ilave edilerek hafifçe pipetaj yapıldı. Bakteri-faj adsorbsiyonunun gerçekleşmesi için cam tüpler 39 °C'de 15 dk benmaride bekletildi. Süre sonunda daha önceden hazırlanıp petrilere dökülmüş Tryptic Soya Agar (Oxoid CM0131) üzerine, faj ve bakteri süspansiyonunu içeren yumuşak agar yayılarak 45 dk kadar donması için bekletildi. Besi yerleri katılaştıktan sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edildi ve takip eden gün faj plaklarının oluşup oluşmadığı kontrol edildi.

Bakteriyofajların Tek Plak İzolasyon Yöntemiyle

Saflaştırılması: Bakteriyofajların saflaştırılması için tek plak yöntemi uygulandı. Bu amaçla kapaklı steril tüp içerisine, çift agar yöntemiyle oluşan faj plakları steril bir bistüri ile tek düştükleri bölgelerden kesilerek bırakıldı. Üzerlerine 3 mL TSB besi yeri ilave edilerek, fajların besi yerine geçişini kolaylaştırmak için hafifçe çalkalandı. Önceden çalkalayıcı etüvde hazırlanan 4 saatlik *A. butzleri* kültüründen 100 µL alınarak aynı tüp içerisine eklendi. Ardından faj-bakteri adsorbsiyonu için 30 dk beklenerek 5 mL TSB besi yeri daha ilave edildi. Hazırlanan faj-bakteri karışımı 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası 8000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek hücre ve besi yeri artıklarının uzaklaştırılması sağlandı. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı önce 0.45 µL'lik sonra 0.22 µL'lik steril şırıngalı uçlu filtrelerden geçirilerek steril bir tüpte toplandı. Elde edilen sıvı, faj titresinin yükseltilmesi için yapılacak analizlerde kullanılmaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

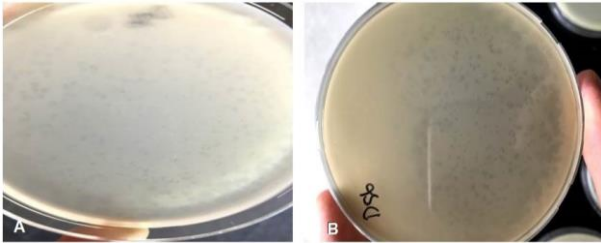
Bakteriyofaj Titresinin Yükseltilmesi:

Bakteriyofaj titresini artırmak amacıyla, öncelikle 1 mL faj lizati ve 0.1 mL 4 saatlik konakçı bakteriden alınarak steril bir eppendorf içerisine oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonu takiben faj-bakteri

süspansiyonu TSB sıvı besi yerine ilave edilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu aşamayı takiben TSB sıvı besi yerindeki bakteri ve faj solüsyonu 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı önce 0.45 µL'lik sonra 0.22 µL'lik filtreden geçirilerek hücre artıkları ortamdaki uzaklaştırıldı. Bu işlem altı kez tekrar edildi. Filtre edilen bakteriyofaj solüsyonu üzerine 5 mL NaCl, 12 mL PEG 8000, 1 mL distile su ilave edildi ve 1 dk vortekslenerek +4 °C'de bir gece bekletildi. Ardından saf faj filtratının çöktürülerek yoğunlaştırılması için 5800 rpm'de 90 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet 500 µl TE buffer ile süspansiyon edildi.

Bulgular

Bingöl ve çevresindeki mevcut tavuk kümesleri ve sığırcı çiftliklerinin bulunduğu yerlerden toplanan çevresel örneklerden sadece iki adet dışkıda *A. butzleri* izolatına karşı potansiyel faj varlığı çift tabakalı agar metoduyla görüldü (Şekil 1). Bakteriyofaj titresinin yükseltilmesi aşaması 6 kez tekrarlandıktan sonra tekrar faj plak oluşumunu gözlemlemek amacıyla çift tabakalı agar yöntemi uygulandı. Daha önce oluşan küçük faj plaklarının, yükseltilmiş faj titresine beraber daha büyük çaplı faj plaklarının (büyük lizis zonları) görülmesi hedeflendi. Ancak daha önce oluşan faj lizis zonlarının oluşmadığı tespit edildi. Önceden oluşan faj plaklarını görebilmek için defalarca farklı yöntem ve metotlar (12-13) denenerek lizis zonlarının oluşması beklendi. Ancak çift tabakalı agar yöntemiyle istenilen sonuca ulaşılamadı.



Şekil 1. Çift tabakalı agar yöntemiyle *A. butzleri* spesifik fajların meydana getirdiği lizis zonları, A ve B; Dışkıdan ilk izole edilen fajların meydana getirdiği lizis zonları

Tartışma

Enfeksiyonların kontrolünde ve tedavisinde fajların kullanılabilirliğine dair ilk veriler Smith ve Huggins (14)'in farelerde yaptıkları deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur. Araştırmacılar *E. coli* 018: K1: H7 bakterisiyle enfekte ettikleri farelere verdikleri spesifik litik etkili fajların en az antibiyotik kadar etkili olduğunu ve ölümleri engellediğini ispat etmişlerdir (14). Bu deneysel çalışmayı takiben diğer bakteriyel enfeksiyonların tedavi ve kontrolünde de fajların kullanılabilirlikleri için *in vivo* ve *in vitro* birçok çalışma yürütülmüştür. Bu amaçla özellikle çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip, insan ve hayvan sağlığını ciddi tehdit eden *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus* gibi patojen bakterilerin faj ile tedavi ve kontrolüne yönelik çalışmalara yoğunlaşmıştır (15-19). Yapılan bu çalışmalar, diğer

patojen bakterilerde de antibiyotik dirençlilik probleminin önümüzdeki yıllarda önemli bir halk sağlığı problemi haline gelebileceğini göstermektedir. Bu nedenle faj terapisi ile ilgili deneysel çalışmaların virulensi daha düşük olan bakteriler için de yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. İnsan ve hayvan bağırsaklarında kommensal olarak bulunan Arkobakterler, özellikle immün sistemi baskılanmış insan ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Yapılan araştırmalarda diğer patojen bakterilerde olduğu gibi Arkobakterlerde de antibiyotik dirençliliğinin giderek artış gösterdiği, gerekli tedbirler alınmadığı takdirde bu enfeksiyonun da hayvan ve insan sağlığını ciddi olarak tehdit edebileceği ortaya konmuştur. Bu nedenle diğer enfeksiyonlarda alternatif olarak kullanılan faj terapisinin *Arkobakter* enfeksiyonlarının da kontrolünde kullanılabilmesine yönelik araştırmaların yapılması bir zorunluluk olarak değerlendirilmektedir. Ancak yapılan literatür taramasında Arkobakterlere spesifik fajların varlığı ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Bu minvalden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada, *Arkobakter* türlerine spesifik fajların varlığının araştırılarak daha sonraki aşamalarda tedavide kullanılabilmesine imkan sağlanması hedeflendi. Arkobakterlerle benzer klinik tablolara neden olan ve aynı familyada yer alan *Kampilobakter* fajların izolasyonu ve enfeksiyonların kontrolünde kullanılabilmesine yönelik araştırmalar yapılmıştır. *Kampilobakter*lerde şu ana kadar çok sayıda spesifik faj tanımlanmış olup, bu fajların kanatlılarda bakteri kolonizasyonunu azalttığına yönelik araştırmalar yapılmıştır (20-22). Bu çalışmada çok geniş bir coğrafik alanda hayvan ve çevresel örneklerden toplanan örneklerde *Arkobakter* spesifik fajların varlığı araştırıldı. Arkobakterlerde faj izolasyonu ile ilgili standart bir metot olmadığından, bu amaçla yaygın olarak kullanılan ve bilimsel olarak kabul edilen çift tabakalı agar yöntemi kullanıldı (12-13). Çalışmada çok geniş bir yelpazede, çok sayıda numune işlenmesine rağmen ilk izolasyonda sadece iki dışkı örneğinde faj plağı tespit edildi. Oldukça sınırlı sayıda faj tespit edilmesi, saha izolatlarında *Arkobakter* spesifik fajların yaygın olmamasından veya izolasyonda kullanılan standart metotların yetersiz olmasından kaynaklanmış olabilir. *A. butzleri* içeren örneklerde spesifik fajların araştırılmasının izolasyon oranını yükselteceği düşünülmektedir. Çalışmada ilk denemede erime gösteren faj plakları elde edilmesine rağmen, faj titresini artırmak amacıyla yapılan sonraki birçok denemelerde fajların erime göstermediği tespit edildi. Bu problemin çözümü için *Kampilobakter* fajları ile ilgili çalışmaları bulunan araştırmacılarla fikir alışverişinde bulunuldu. Yapılan değerlendirmeler neticesinde, meydana gelen erimelerin faj kaynaklı olma olasılığının çok yüksek olduğu, özellikle ilk kez çalışılan fajlarda bu çalışmada yaşanan problemlerin doğal ve yaygın olduğu, elde edilen fajların temperate faj ya da profaj olma olasılığının da olduğu ve bu nedenle dökme yöntemiyle faj denemesinin tekrar edilmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı. Ancak, bu doğrultuda yapılan denemelerden herhangi bir sonuç elde edilemedi. Çalışmada kullanılan *A. butzleri* referans suşlarının sürekli kültürlerinin yapılması ile başlangıçta yoğun üreyen bakterinin daha şeffaf bir üreme gösterdiği tespit

edildi. Ayrıca fajların referans suşa karşı bir direnç geliştirme olasılığı olabileceği değerlendirildi. Bu nedenle sorunun bakteri suşu ile ilişkili olabileceği düşünülerek kanatlı orijinli yedi adet saha izolatında analizler tekrar yapıldı. Ancak bu izolatlarda da herhangi bir olumlu sonuç elde edilemedi.

Bir bakteriye spesifik ilk faj izolasyonunda yukarıda ifade edilen problemlerin yaşandığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (22-24). *Arcobacter* benzeri bir patojen olan *Kampilobakter*lerde ilk faj izolasyonları yapılırken benzer sorunlar yaşandığı, bu sorunların fajla ilgili olduğu gibi bakteri türünün yapısıyla da ilgili olabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, geçmişte karşılaşılan birçok sorun, bu fajlar üzerine yapılan yoğun çalışmalar ile çözülebilmektedir. Böylece, *Kampilobakter* fajlarının hızlı bir şekilde saptanmasına, izolasyonuna ve karakterizasyonuna izin veren protokoller geliştirilmiş ve başarıyla kullanılmıştır (12-13).

Sonuç olarak; toplanan çevresel örneklerde *A. butzleri*'ye spesifik litik etkili fajların varlığı ile ilgili önemli ipuçları elde edilmesine rağmen bununla ilgili kesin bir

veriye ulaşılamadı. Fajların en önemli özelliklerinden birisinde tür spesifik, hatta suş spesifik özellik gösterebilmesidir. Bu nedenle izole edilen fajların varlığını kesin kanıtlamak için mümkün olduğu kadar fazla saha suşunda bu denemelerin yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca rutin olarak kullanılan faj izolasyon metodunun yetersiz olabileceği ve bu nedenle *Arcobakter*lere spesifik yeni bir metodolojinin geliştirilmesine ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla gelecek çalışmalarda *Arcobakter*lere özgü standart bir metod geliştirilmesi ve elde edilen faj stoklarının profaj olma ihtimalinin dikkate alınarak bu yönde araştırmaların sürdürülmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı.

Teşekkür

Katkılarından dolayı TÜBİTAK'a, *A. butzleri* saha izolatlarını temin ettiğimiz Dr. Elif ÇELİK'e ve uygulanan metodların yorumlanmasında iletişime geçtiğimiz Dr. Y. Emre GENÇAY'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Van den Abeele AM, Vogelaers D, Van Hende J, et al. Prevalence of *Arcobacter* Species among Humans, Belgium, 2008–2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1731-1734.
2. Logan EF, Neill SD, Mackie DP. Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*. *Vet Rec* 1982; 110: 229-230.
3. Schroeder-Tucker L, Wesley IV, Kiehlbauch JA, et al. Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 186-195.
4. Collado L, Figueras MJ. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 174-192.
5. Açık MN, Yüksel H, Ulucan A, et al. The first experimental research on the pathogenicity of *Arcobacter butzleri* in zebrafish. *Vet Microbiol* 2016; 189: 32-38.
6. Clark NM, Zhanel GG, Lynch III JP. Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat. *Curr Opin Crit Care* 2016; 22: 491-499.
7. Ryu S, Head MG, Kim BI, et al. Are we investing wisely? A systematic analysis of nationally funded antimicrobial resistance projects in Republic of Korea, 2003-2013. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; 7: 90-94.
8. Abay S, Kayman T, Hizlisoy H, et al. In vitro antibacterial susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolated from different sources. *J Vet Med Sci* 2012; 74: 613-616.
9. Kayman T, Abay S, Hizlisoy H, et al. Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: Molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated *Arcobacter*s. *J Med Microbiol* 2012; 61: 1439-1444.
10. Rahimi E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. *British Poult Sci* 2014; 55: 174-180.
11. Loc Carrillo CM, Connerton PL, Pearson T, et al. Free-range layer chickens as a source of *Campylobacter* bacteriophage. *Antonie Van Leeuwenhoe* 2007; 92: 275-284.
12. Gencay YE, Birk T, Bronsted L, et al. *Campylobacter jejuni* Methods and Protocols. In: Butcher J, Stintzi A. (Editors). *Methods for isolation, purification, and propagation of bacteriophages of Campylobacter jejuni*. Chapter 3. Humana Press, New York: 2017: 19-28.
13. Hockett KL, Baltrus DA. Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. *JoVE* 2017; 119: e55064.
14. Smith HW, Huggins MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol* 1982; 128: 307-318.
15. Spricigo DA, Bardina C, Cortés P, et al. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol* 2013; 165: 169-174.
16. Chan BK, Sistro M, Wertz JE et al. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 2016; 6: 26717.
17. Wang Z, Zheng P, Ji W, et al. SLPW: A virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Front Microbiol* 2016; 15: 934.
18. Jansen M, Wahida A, Latz S, et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep* 2018; 8: 14140.
19. Tan D, Zhang Y, Cheng M, et al. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates and their interactions with lytic phages. *Viruses* 2019; 11: 1080.
20. Carvalho CM, Gannon BW, Halfhide DE, et al. The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to

- reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. BMC Microbiol 2010; 10: 232.
21. Fischer S, Kittler S, Klein G, et al. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. PLoS One 2013; 8: e78543.
 22. Jäckel C, Hammerl JA, Hertwig S. *campylobacter* phage isolation and characterization: What we have learned so far. Methods Protoc 2019; 2: 18.
 23. Makino K, Yokoyama K, Kubota Y, et al. Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. Genes Genet Syst 1999; 74: 227-239.
 24. Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, et al. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. Gene 2000; 258:127-139.