

[原 著]

血液培養液の遠心上清を用いる新たな直接遊離型コアグララーゼ試験の検討

田中真輝人¹⁾・品川雅明¹⁾・葦澤慎也¹⁾・佐伯理知¹⁾

八楯佑貴¹⁾・佐藤勇樹¹⁾・高橋 聡¹⁾²⁾

¹⁾ 札幌医科大学附属病院検査部

²⁾ 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座

(平成 30 年 4 月 25 日受付, 平成 30 年 8 月 10 日受理)

血液培養液の遠心上清液を試料とする新たな直接遊離型コアグララーゼ試験 (Direct Tube Coagulase Test : DTCT, 以下本法)について検討した。対象は, 当院の血液培養検査にて検出された, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 63 例および, Coagulase negative staphylococci (CNS) 50 例とした。試料は, 血液培養原液および培養上清液を用いた。ウサギ血漿は, 『ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清「生研」(以下, デンカ)』と「ウサギプラスマ「榮研」(以下, 榮研)」を用いた。検査条件には, 両ウサギ血漿 500 μ L に培養原液または培養上清液をそれぞれ 100, 300, 500 μ L ずつ添加する 12 条件を設定した。添加, 混和後, 37°C 孵卵器にて 0.5, 1, 2, 4, 24 時間培養し, フィブリン析出や凝固を認めた場合, DTCT 陽性とした。各々の条件および判定時間における感度を比較し, 最も迅速かつ高感度に判定できる条件を検討した。また, 血液培養条件(好気, 嫌気)間, メチシリン耐性の有無で DTCT の感度に差が生じるか解析した。その結果, デンカウサギ血漿 500 μ L に培養上清液を 300 μ L 添加する条件(以下, 本条件)が, 他の条件と比較し, いずれの判定時間においても感度が上回っていた。また, 本条件における, 血液培養条件間およびメチシリン耐性の有無による DTCT 感度に差はなかった。さらに, CNS 50 例について, 本条件による DTCT を行ったところ, 全例陰性であった。本法は, 従来の DTCT と比較し, 迅速性および感度に優れ, 血液培養からの直接 *S. aureus* 鑑別法として有用であった。

Key words: 敗血症, 血液培養, *Staphylococcus aureus*, コアグララーゼ, 迅速同定

序 文

敗血症は, 感染によって発症した全身性炎症反応症候群と定義され, 発症早期に適切な抗菌薬治療が行われなければ, 重症敗血症や敗血症性ショックへと連続的に重症化し, 最終的に多臓器機能不全症候群に至る^{1)~3)}。*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) は, 敗血症の主要な原因菌であり, Kumar らは, 原因菌が同定された敗血症性ショック 4,056 例のうち 14.7% で *S. aureus* が原因菌であると報告した⁴⁾。一方, Coagulase negative staphylococci (CNS) は, 皮膚常在菌層を構成する主要細菌であることから, 血液培養採取時におけるコンタミネーションの原因菌としてしばしば分離されるものの, 敗血症を引き起こすことは比較的少ない⁵⁾。また, 敗血症へ至った症例においても, その死亡率は他の菌種と比べ低いことが報告されている⁶⁾。すなわち, 血液培養検査陽性例で, ブドウ球菌が疑われた場合, 速やかに *S. aureus* か否か鑑別し報告することは, 臨床上極めて有益な情報であり, 患者の予後にも大きな影響を与える。

Clinical Microbiology procedures handbook 4th (American society for microbiology) では, その迅速鑑別法として, 血液培養液とウサギ血漿を用いた直接遊離型コアグララーゼ試験 (Direct Tube Coagulase Test : DTCT) を推奨している⁷⁾。しかし, その中で, DTCT に用いる試料, およびウサギ血漿の量や判定時間など, 検査条件に関する詳細な記載がされていない。さらに, 現在まで, 血液培養液からの DTCT はいくつか報告されているが^{8)~11)}, いずれも, 血液培養液をそのまま使用しているため, 血球成分の混入により, 反応早期に観察される微弱なフィブリン析出の判定が困難である。すなわち, 設定される検査条件次第で, DTCT の成績が変動する可能性がある。実際, 多くの先行研究では, 検査条件が各々で異なっており, いずれも特異度は良好であるものの, 感度にはばらつきが大きい^{8)~11)}。さらに, 既報における DTCT の感度の多くは, 試験開始後 2 時間時以降の成績であり, より早期判定の検討が必要である。そこで今回, 従来の DTCT (以下, 従来法) の問題点を解決するため, 血液培養液の遠心上清を試料とする新たな DTCT (以下, 本法) を考案し, 2 法の結果を比較した。また, 本法において, 最も迅速かつ高感度に判定できる最良条件の設定を試み, その有用性について評価したので報告する。

著者連絡先 : (〒060-8543) 北海道札幌市中央区南 1 条西 16 丁目
札幌医科大学附属病院検査部 細菌検査係
田中真輝人
TEL: 011-611-2111(内線 : 36450)
FAX: 011-615-3646
E-mail: mkt-tnk@sapmed.ac.jp

材料と方法

当院において, 2016 年 5 月から 2017 年 5 月の間に, 血液

表1. 培養原液における DTCT の感度の比較 (n=63)

判定時間	感度 (%)					
	デンカウサギ血漿			栄研ウサギ血漿		
	培養原液			培養原液		
	100 μ L	300 μ L	500 μ L	100 μ L	300 μ L	500 μ L
0.5 hr	18	16	8	27	5	5
1 hr	32	29	11	35	10	5
2 hr	44	35	22	60	13	10
4 hr	64	46	40	70	19	11
24 hr	79	81	81	91	75	70

DTCT : Direct Tube Coagulase Test
(デンカおよび栄研ウサギ血漿 500 μ L : 培養原液 100, 300, 500 μ L)

培養検査陽性となり、質量分析装置 MALDI-Biotyper (ブルカー・ジャパン : 神奈川) により直接同定された、*S. aureus* 63 例および CNS 50 例を対象とした。血液培養ボトルは、好気用に「BD バクテック™ 23F 好気用レズンボトル P」、嫌気用に「BD バクテック™ 22F 嫌気用レズンボトル P」(いずれも日本 BD : 東京) を用い、*S. aureus* 63 例のうち、33 例が好気ボトル、30 例が嫌気ボトルで検出された。対象菌種はすべて、血液培養液からの直接同定後、サブカルチャーで得られたコロニーを MALDI-Biotyper によって再度同定し、同一菌種であることを確認した。なお、本検討は当院臨床研究審査委員会の承認 (整理番号 ; 292-194) を経て、実施した。

1. 試料

試料は、血液培養陽性ボトルから採取した血液培養液 (以下、培養原液) と、培養原液を 15,000 rpm, 5 分間遠心 (himac CF15RXII, 工機ホールディングス : 東京) した後の血液培養上清液 (以下、培養上清液) の 2 種とした。

2. ウサギ血漿

ウサギ血漿は、市販されている『ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清「生研」』(デンカ生研 : 東京, 以下デンカウサギ血漿) と、「ウサギプラズマ「栄研」」(栄研化学 : 東京, 以下栄研ウサギ血漿) の、2 種とした。各ウサギ血漿凍結乾燥品は、添付文書に従い溶解後、DTCT に使用した。

3. DTCT の条件と方法

DTCT の試料およびウサギ血漿混合量の条件は、デンカあるいは栄研ウサギ血漿 500 μ L に対して、培養原液または培養上清液をそれぞれ、100, 300, 500 μ L ずつ添加する 12 条件を設定した。ウサギ血漿に試料を添加し混和後、37°C 孵卵器でインキュベートを行った。判定は、インキュベート後 0.5, 1, 2, 4, さらに 24 時間で行い、フィブリンの析出あるいは凝固を認めた場合、DTCT 陽性すなわち *S. aureus* とした。一方、フィブリンの析出および凝固を認めなかったものを、DTCT 陰性と判定した。

4. 最良条件の決定

各条件における感度を比較し、24 時間判定時に最も高感度を示した条件の中で、0.5 時間判定時の感度が最も良好な条件とした。

5. 血液培養条件による影響

DTCT 判定に、血液培養条件が影響をおよぼすか否か検

表2. 培養上清液における DTCT の感度の比較 (n=63)

判定時間	感度 (%)					
	デンカウサギ血漿			栄研ウサギ血漿		
	培養上清液			培養上清液		
	100 μ L	300 μ L	500 μ L	100 μ L	300 μ L	500 μ L
0.5 hr	35	78	68	37	33	32
1 hr	46	86	75	51	40	37
2 hr	56	94	89	68	68	62
4 hr	65	97	95	81	95	95
24 hr	87	100	100	97	100	100

DTCT : Direct Tube Coagulase Test
(デンカおよび栄研ウサギ血漿 500 μ L : 培養上清液 100, 300, 500 μ L)

討するため、*S. aureus* 63 例について、最良条件による好気および嫌気ボトルにおける DTCT の感度を比較した。

6. メチシリン耐性の有無による影響

DTCT 判定に、メチシリン耐性の有無が影響をおよぼすか否か検討するため、*S. aureus* 63 例について、最良条件による methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) および methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) における DTCT 結果を比較した。なお、MSSA および MRSA の鑑別は、PCR 法による *mecA* 遺伝子の有無および CLSI に準拠した微量液体希釈法にて行った。

7. CNS における DTCT

CNS 50 例について、最良条件にて DTCT を実施し、反応性を確認した。

8. 統計解析

DTCT 結果の有意差検定には、Fisher's exact test を用いた。また、統計学的有意性は $P < 0.05$ で有意差ありとした。解析には、StatFlex ver.6 を用いた。

結 果

1. 培養原液と培養上清液における DTCT の成績の比較

培養原液における成績を表 1、培養上清液の成績を表 2 に示した。まず、培養原液における 24 時間判定時の感度は、栄研ウサギ血漿に対し培養原液 100 μ L 添加時が 91% と最も高かった。一方、培養上清液における 24 時間判定時の感度は、デンカおよび栄研ウサギ血漿いずれも、培養上清液を 300 あるいは 500 μ L 添加した条件で 100% を示し、明らかに培養上清液を用いた方が良好な成績であった。そこで、デンカおよび栄研ウサギ血漿に培養上清液をそれぞれ 300 および 500 μ L 添加する 4 条件について、0.5 時間判定時の感度を比較した。その結果、デンカウサギ血漿に対し、培養上清液を 300 μ L 添加する条件が、78% で最も高感度であり、これを最良条件と決定した。

2. 血液培養条件による DTCT 成績の比較 (表 3)

好気ボトルと嫌気ボトルによる DTCT の感度に違いがあるか否か確認した。結果、24 時間判定時ではいずれも 100% であった。一方、0.5, 1, 2, 4 時間判定時では、好気ボトルで若干高い傾向であったが有意差は認められなかった。

3. メチシリン耐性の有無による DTCT 成績の比較 (表 4)

S. aureus 63 例のうち、MSSA 37 例、MRSA 26 例であっ

表 3. 好気および嫌気ボトルにおける DTCT の感度の比較 (n=63)

判定時間	感度 (%)		P 値
	好気ボトル (n=33)	嫌気ボトル (n=30)	
0.5 hr	82	73	0.55
1 hr	94	80	0.14
2 hr	100	90	0.10
4 hr	100	93	0.22
24 hr	100	100	

DTCT : Direct Tube Coagulase Test

表 4. MSSA および MRSA における DTCT の感度の比較 (n=63)

判定時間	感度 (%)		P 値
	MSSA (n=37)	MRSA (n=26)	
0.5 hr	76	81	0.76
1 hr	81	92	0.29
2 hr	92	96	0.64
4 hr	97	96	1.0
24 hr	100	100	

DTCT : Direct Tube Coagulase Test

た。メチシリン耐性の有無で DTCT の感度に違いがあるか否か確認したところ、24 時間判定時においてはいずれも 100% であった。一方、0.5、1、2、4 時間判定時では、同等あるいは MRSA で若干高い傾向であったものの有意差は認められなかった。

4. CNS における DTCT 成績

CNS 50 例について、最良条件により DTCT を行ったところ、全例が陰性を示し、偽陽性はなかった。

考 察

今回我々は、DTCT に用いる試料において、以前の培養原液から培養上清液に変更することで、反応早期における陽性判定の感度が向上することを想定し、検討を行った。その結果、培養原液よりも培養上清液において感度が高く、その中でもデンカウサギ血漿 500 μ L に対して、培養上清液を 300 μ L 添加する条件が、最も迅速かつ高感度に判定できることが確認された。

DTCT は、試験管内にてウサギ血漿と血液培養液を混和し、インキュベート後、フィブリンの析出あるいは凝固の有無をもとに判定する。培養原液を試料とした場合、ウサギ血漿に、コアグラーゼ成分とともに血球成分が混入するため、背景が赤色に濁り、目視による反応早期の微弱なフィブリン析出判定を妨げる (図 1)。一方、血液培養液を遠心し、血球成分を沈殿除去した上清液を使用する本法では、背景が透明化され反応早期、すなわち 0.5、1 時間時における感度が向上したと示唆された (図 2)。なお、遊離型コアグラーゼは酵素成分の一種で、遠心後の上清に残存するため、培養上清液を試料として用いた場合も反応に影響を与えない。既報による DTCT の感度は、2 時間判定時：34~80%、4 時間判定時：65~85%、24 時間判定時：94~97% である^{8)~11)}。一方、本法における 2、4、24 時間判定時の感度は、それぞれ、

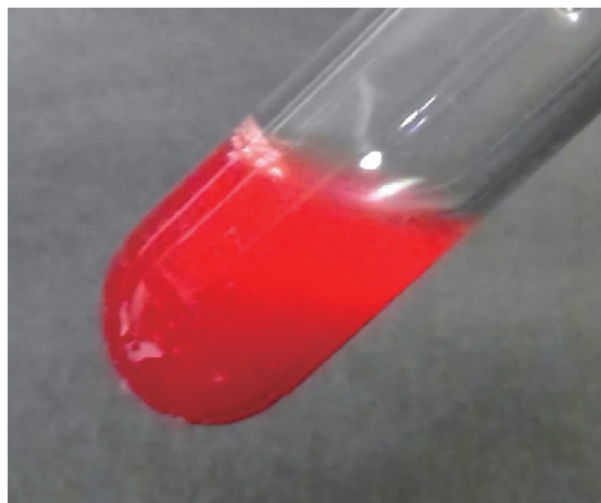


図 1. 培養原液における判定

デンカウサギ血漿 500 μ L に対して、培養原液を 300 μ L 混和し、37°C 30 分間インキュベート後、判定を行った。血球成分の混入で背景が赤色に濁るため、反応早期における微弱なフィブリン析出を捉えることができず、DTCT 陰性と判定された。

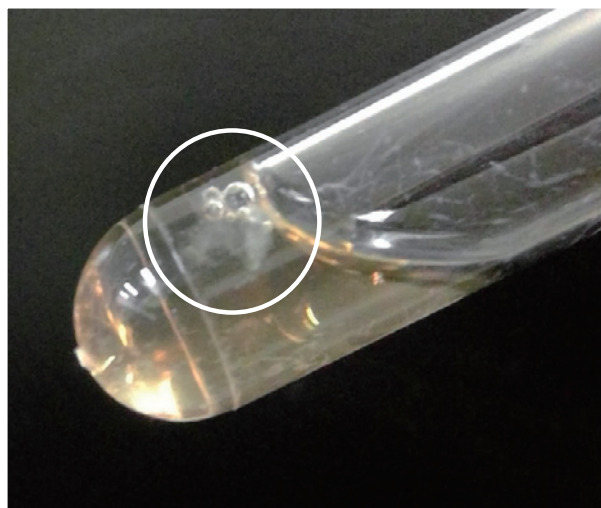


図 2. 培養上清液における判定 (○内が微弱フィブリン)

デンカウサギ血漿 500 μ L に対して、培養上清液を 300 μ L 混和し、37°C 30 分間インキュベート後、判定を行った。血球成分を沈殿除去した培養上清液を用いることで、背景が透明化し、反応早期の微弱なフィブリン析出を捉えることが可能となり、DTCT 陽性と判定された。

94、97、100% であり、既報に比べ明らかに良好な成績であった。また、より早期である 0.5 および 1 時間判定時の感度は、これまで報告されていないが、我々の検討ではそれぞれ 78、86% で、既報における 2~4 時間判定時と同等もしくはそれ以上の感度を有していた。すなわち、本法では、従来法よりも、迅速かつ高感度に *S. aureus* を鑑別できることが明らかとなった。

培養上清液の最良添加量は、コアグラーゼ量がより多いと予想される 500 μ L ではなく、それよりも少ない 300 μ L であった。血液培養ボトル内には、抗凝固剤として Sodium

Polyanethol Sulfonate (SPS) を含有しており、これは DTCT 反応に阻害的な影響を与えることが知られている。当院で使用している血液培養ボトル内には、0.05% 濃度の SPS を含有している。すなわち、ウサギ血漿 500 μ L に対して培養上清液を 300,500 μ L 混和した時の SPS の終濃度はそれぞれ、0.01875, 0.025% となり、0.00625% の濃度差があると推定される。Varettas らは、0.0008% という極めてわずかな SPS 濃度が、DTCT 反応に影響を与えると報告しており¹²⁾、培養上清液 300 μ L と比較し、500 μ L では試験に供されるコアグラゼ量が増えるものの、SPS の量も増加するため、DTCT の感度が低下した可能性が考えられた。一方、培養原液を用いた条件では、100 μ L の感度が他の添加量の感度を上回った。これは、血球成分の混入が多くなるほど、反応に影響を与える可能性が考えられたが、詳細は不明であった。

各社のウサギ血漿については、デンカウサギ血漿が栄研ウサギ血漿を用いた場合より優れた成績であった。栄研ウサギ血漿は、精製水のみで溶解するのに対し、デンカウサギ血漿では、生理食塩水で溶解後、専用の希釈液で希釈しているため、溶媒の組成の違いが要因として考えられたが、詳細は不明であった。

培養条件およびメチシリン耐性の有無により、DTCT の結果に差が生ずるか否かは、DTCT を行う上で重要な情報である。これまでの培養原液による検討では、Qian らが、*S. aureus* が検出された好気ボトル 32 例、嫌気ボトル 32 例を用いて DTCT を行い、その感度に有意差がなかったことを報告した⁸⁾。また、Speers らは、MSSA と MRSA 間において、DTCT の感度に有意差がなかったことを報告している¹³⁾。我々の解析では、試料に培養上清液を用いても、培養条件あるいはメチシリン耐性の有無により、DTCT の感度に影響がないことが確認された。

上述のように、DTCT の感度は検査条件の違いによりばらつきがみられるが、いずれの報告でも特異度は良好で、偽陽性はほとんど認められない。本条件でも、CNS 50 例について DTCT を行ったところ、偽陽性はなく特異度 100% であった。しかし、Qian らは、わずかな偽陽性例を報告 (特異度: 99.7%) しており、これらは *S. aureus* 以外のコアグラゼ陽性ブドウ球菌に起因するものであると考えられた⁸⁾。コアグラゼ陽性ブドウ球菌には、*S. aureus* 以外に、*Staphylococcus intermedius* や *Staphylococcus pseudintermedius* など、いくつかの菌種が存在する¹⁴⁾¹⁵⁾。これらを DTCT で *S. aureus* と鑑別することは難しく、DTCT の限界と言える。しかし、*S. aureus* 以外のコアグラゼ陽性ブドウ球菌のほとんどは動物由来であり¹⁶⁾¹⁷⁾、ヒトから分離される頻度は少ない。そのため、血液培養から検出されることはまれであり、通常 DTCT の結果を解釈する上で問題はないと考えられる。実際、当院において、過去 5 年間に、*S. aureus* 以外のコアグラゼ陽性ブドウ球菌の血液培養検出例は存在しなかった。

また、DTCT は、従来法、本法によらず、判定が目視であるため、少なからず検査者間差が生ずる。簡便な方法ではあるものの、微弱なフィブリン析出判定に起因し、検査者間で判定感度に差が生じることが報告されている⁸⁾⁹⁾。培養上清液を用いることで、従来法と比較し判定はさらに容易となったが、より微細な陽性反応を素早くとらえるために、検査者

のトレーニングは必須である (図 1, 2)。

血液培養にて *S. aureus* が検出され、迅速かつ適切な抗菌薬治療が行われなかった場合、死亡率の増加や在院日数の延長をきたす¹⁸⁾。敗血症をきたした症例において、治療開始が 1 時間遅れる毎に生存率が 7.6% ずつ減少するという報告³⁾もあり、血液培養液からの迅速かつ正確な菌種同定は患者生命に大きく寄与する。そのため、近年普及しつつある質量分析装置を用いた血液培養液からの直接菌種同定法は非常に有用である¹⁹⁾が、機器が高価であり、導入できる施設は限られる。その現状を加味すると、安価かつ簡便である DTCT は、さらに検討され普及すべき検査法である。今回我々が検討した、血液培養液の遠心上清を用いる、新たな DTCT とその最良条件は、従来法よりも、迅速性および感度に優れていた。さらに、偽陽性の可能性はまれであるため、DTCT 陽性と判定された段階で、「血液培養 *S. aureus* 陽性」という治療上極めて有益な情報を、速やかに臨床に提供することができる。以上、本法は血液培養液からの直接 *S. aureus* 鑑別法として有用であり、敗血症の早期治療に貢献できると考えられる。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 船田 久. 2007. 各種感染症における抗菌薬の使い方 敗血症治療. 臨床と研究 84: 1343-8.
- 2) American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 20: 864.
- 3) Bone, RC, CJ Fisher Jr, TP Clemmer, et al. 1989. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. Crit Care Med 17: 389-93.
- 4) Kumar, A, P Ellis, Y Arabi, et al. 2009. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. Chest 136: 1237-48.
- 5) Pien, BC, P Sundaram, N Raoof, et al. 2010. The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. Am J Med 123: 819-28.
- 6) Weinstein, MP, ML Towns, SM Quartey, et al. 1997. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: A prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 24: 584-602.
- 7) Leber, AL. 2016. Clinical microbiology procedures handbook (4th ed), p. 3418-9, ASM press, Washington, DC.
- 8) Qian, Q, K Eichelberger, JE Kirby. 2007. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by use of the direct tube coagulase test. J Clin Microbiol 45: 2267-9.
- 9) McDonald, CL, K Chapin. 1995. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles by a classic 2-hour tube coagulase test. J Clin Microbiol 33: 50-2.
- 10) Chapin, K, M Musgung. 2003. Evaluation of three rapid methods for the direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures. J Clin Microbiol 41: 4324-7.

- 11) Dhiman, N, TL Trienski, LP DiPersio, et al. 2013. Evaluation of the BinaxNOW *Staphylococcus aureus* test for rapid identification of Gram-positive cocci from VersaTREK blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 51: 2939-42.
- 12) Varetas, K, C Mukerjee, PC Taylor. 2005. Anticoagulant carryover may influence clot formation in direct tube coagulase tests from blood cultures. *J Clin Microbiol* 43: 4613-5.
- 13) Speers, DJ, TR Olma, GL Gilbert. 1998. Evaluation of four methods for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood cultures. *J Clin Microbiol* 36: 1032-4.
- 14) 三澤慶樹, 吉田 敦, 奥住捷子. 2015. コアグララーゼ試験およびラテックス凝集反応: *Staphylococcus* 属の鑑別におけるピットフォール. *日本臨床微生物学雑誌* 25: 19-25.
- 15) Versalovic, J. 2011. American Society for Microbiology. In: *Manual of clinical microbiology* (10th ed), ASM Press, Washington, DC.
- 16) Sasaki, T, S Tsubakishita, Y Tanaka, et al. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol* 48: 765-9.
- 17) Vandenesch, F, C Lebeau, M Bes, et al. 1994. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. *J Clin Microbiol* 32: 388-92.
- 18) Lodise, TP, PS McKinnon, L Swiderski, et al. 2003. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 36: 1418-23.
- 19) 大楠清文. 2012. 質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. *Modern Media* 58: 113-22.

Investigation of New Direct Tube Coagulase Test using Centrifuged Supernatant of Blood Culture

Makito Tanaka¹⁾, Masaaki Shinagawa¹⁾, Shinya Nirasawa¹⁾, Masachika Saeki¹⁾,
Yuki Yakuwa¹⁾, Yuki Sato¹⁾, Satoshi Takahashi^{1) 2)}

¹⁾Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital, Japan

²⁾Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine, Japan

It is very important to identify *Staphylococcus aureus* rapidly from a bottle that has become positive for blood culture. In the Clinical Microbiology procedures handbook 4th, Direct Tube Coagulase Test (DTCT) have been recommended for testing the identification of *S. aureus* from a blood culture bottles. However, there are two problems in this method. One of that there is no definition about the test condition such as sample volume and reaction time. And the other, it is difficult to judge at an early point due to contamination of the blood cell component. Thus, we evaluated usefulness of the new DTCT using culture supernatant as a specimen. Sixty-three blood culture specimens that detected *S. aureus* were tested. As a result, it was shown that the best condition of new DTCT was to mix 500 μ L of rabbit plasma with 300 μ L of culture supernatant. The sensitivity of detection at 0.5, 1, 2, 4 and 24 h time points of the new DTCT using the best test condition was 78, 86, 94, 97 and 100%, respectively. On the other hand, the specificity of detection at 24 h time point was 100%. Furthermore, the sensitivity of new DTCT was no significant difference between aerobic and anaerobic culture. Similarly, there was no significant difference between methicillin-susceptible *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*. In conclusion, the new DTCT was useful as direct identification method of *S. aureus* from blood culture and suggested that contribute to prompt treatment of sepsis.