



HANDBUCH

RELEASE 01.MAI 2015 VERSION VON FEB. 2021 GÜLTIG AB VERSION 3.0.

TOXICITY RESPONSE ANALYSIS AND TESTING

Handbuch zur Bedienung von

ToxRat[®]

© ToxRat Solutions GmbH
Naheweg 15 • 52477 Alsdorf
Germany
Phone +49 2404 67 67 67 • Fax +49 2404 82 66 9
ToxRat@ToxRat.com
www.ToxRat.com

Inhaltsverzeichnis

1	Über dieses Handbuch	1
2	Vorwort: Was Sie über ToxRat wissen sollten	2
2.1	Auswerte-Ebenen	3
2.2	Daten-Vorlagen: Masterbooks und Workbooks	4
2.3	Statistische Auswertung	5
3	Es geht los - Eine Datei erstellen	6
3.1	Menüs und Buttons im Startbildschirm.....	6
3.2	Workbook oder Masterbook – Das ist hier die Frage!.....	8
3.3	Datenvorlage öffnen	8
3.3.1	Die Struktur von Workbooks und Masterbooks	11
3.3.2	Das Deckblatt (General Notes).....	12
3.3.3	Die Datenblätter (Input Raw Data).....	14
3.4	Dateneingabe in Workbooks und Masterbooks.....	18
3.5	Editieren von Workbooks und Masterbooks – der Workbookdesigner	19
4	Die Auswertung.....	23
4.1	Menüs und Buttons im Auswertebildschirm – Auswertung starten	23
4.1.1	Der Auswertebildschirm bei Biotest-Workbooks	23
4.1.2	Der Auswertebildschirm bei Generic-Data-Workbooks.....	25
4.2	Welche Daten auswerten? Das „Selections“-Menü.....	26
4.3	Auswahl der statistischen Methode.....	29
4.3.1	Auswahl der statistischen Methode bei Biotest-Workbooks	29
4.3.2	Auswahl der statistischen Methode bei Generic Data-Workbooks.....	30
4.3.3	Einstellungen prüfen, speichern und Standard-Einstellungen wieder herstellen	33
4.4	Verfahren zur NOEC-Bestimmung (multiples Testen).....	35
4.4.1.	NOEC-Bestimmung für metrische Daten	37
4.4.1	NOEC-Bestimmung für quantale Daten	42
4.5	Verfahren zur Bestimmung einer Limit-Konzentration / paarweises Testen.....	47
4.6	Hemmwertbestimmung (Effect Level, ELx)	49
4.6.1	Lineare Regression.....	51
4.6.2	Nicht-Lineare Regression.....	56
4.6.3	Interpolation.....	63
4.7	Manuelle Auswahl einzelner statistischer Verfahren	65
4.7.1	Statistische Kenngrößen („Simple Statistics“).....	67
4.7.2	Varianzanalyse („Analysis of Variance“)	67
4.7.3	Varianzanalyse plus Trendanalyse (“Analysis of Variance plus Trend“).....	68
4.7.4	Tests auf Normalverteilung („Testing Normal Distribution“).....	69
4.7.5	Tests auf Varianzhomogenität (“Testing Variance Homogeneity“)	69

4.7.6	Tests auf Monotonie durch Kontrastanalyse („Analysis of Monotone Trend by Contrasts“)	70
4.7.7	Paarweise Tests (“Two-Sample Comparisons“)	71
4.7.8	Multiple Tests („Multiple Comparison with a Control“)	72
4.7.9	Ausreißertests („Outlier Tests“)	72
4.8	Umgang mit einer Lösungsmittelkontrolle	74
4.9	Validitätsprüfung	76
5	Biotestspezifische Einstellungen und Informationen	78
5.1	Algenwachstumstest (OECD 201, OCSP 850.5400, DIN 38412, ISO 8692)	78
5.2	Daphnienreproduktionstest (OECD 211)	80
5.3	Chironomus Toxizitätstest (OECD 218/219)	81
6	Das Ergebnis	86
6.1	Menüs und Buttons im Ergebnis-Bildschirm	86
6.2	Graphiken	87
6.3	Tabellen	90
6.3.1	Tabelle Zusammenfassung („Summary“)	92
6.3.2	Ergebnistabellen für Ausreißertests	93
6.3.3	Ergebnistabellen für ECx Bestimmung, lineare Regression	94
6.3.4	Ergebnistabellen für ECx Bestimmung, nicht-lineare Regression	98
6.3.5	Ergebnistabellen für parametrische Tests – MDD als Maß für Teststärke	103
6.4	Formatierung	104
6.4.1	Dezimaltrennzeichen	104
6.4.2	Anzahl Nachkommastellen	104
6.5	Optionale Einstellungen	107
6.5.1	Chronic Value (ChV)	107
6.5.2	Settings	108
6.5.3	Ausgabe nicht signifikanter und / oder aller EC-Werte	109
6.5.4	Erzeugen von Übersichtstabellen	109
6.5.5	Automatische Darstellung des Auswertedatums	111
7	Der Report	113
7.1	Menüs und Buttons im Berichts-Bildschirm	114
7.2	Optionale Einstellungen für den Report	116
8	GLP Konformität, Validierung	118
9	Installation	119
9.1	Lokale Installation	119
9.2	Server- Installation	124
9.3	ToxRat deinstallieren	124
10	Mitgelieferte Datenvorlagen	125
11	Index	127

1 Über dieses Handbuch

Oder: Was Sie erwartet

Dieses Handbuch soll Ihnen helfen, sich schnell in ToxRat einzuarbeiten und möglichst rasch nicht nur Ihre Biotestdaten auszuwerten, sondern die Ergebnisse auch ansprechend darzustellen. In Kapitel 2 erfahren Sie, was Sie über ToxRat wissen sollten, d.h. wie ToxRat grundsätzlich aufgebaut ist und worin das typische Grundprinzip besteht. Dazu erklären wir Ihnen die Bedeutung der mitgelieferten Demodateien und Auswertevorlagen und den Unterschied zwischen manuell gesteuerten Auswertungen und Programm-gesteuerten Auswertungen. Diese Grundlagen bitte unbedingt lesen!

Falls Sie ungern Handbücher lesen und lieber direkt loslegen, genügen diese Grundlagen bereits; nutzen Sie die mitgelieferten Demodateien, um sich selbst ganz praktisch „by doing“ einzuarbeiten. Bei gezielten Fragen zu einzelnen Themen finden Sie passende Abschnitte in diesem Handbuch über das Stichwortverzeichnis. Falls Sie weiter lesen möchten:

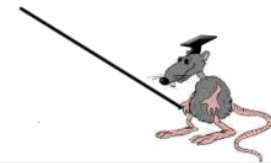
Ab Kapitel 3 finden Sie eine ausführliche Anleitung zur Programmbedienung. Dabei orientiert sich dieses Handbuch an der praktischen Vorgehensweise beim Auswerten von Biotest-Daten, d.h wir zeigen Ihnen die Bedienung Schritt für Schritt, angefangen bei der Dateneingabe, über die Methodenauswahl und die Darstellung der Ergebnisse, bis hin zur Erstellung eines Reports.

Sie werden sehen, dass aufgrund des integrierten Expertensystems und der Verwendung der mitgelieferten Datenvorlagen auch Nicht-Statistik-Experten mit ToxRat korrekte statistische Auswertungen durchführen können. Nichtsdestotrotz werden in der Benutzeroberfläche und in diesem Handbuch statistische Fachbegriffe verwendet. An der einen oder anderen Stelle erhalten Sie dabei ein wenig Nachhilfe in Sachen Statistik - dies beschränkt sich jedoch auf das Nötigste, da es sonst den Rahmen eines Handbuchs sprengen würde. Falls nötig, informieren Sie sich bitte anhand entsprechender Lehrbücher zur Statistik.

Eine Info vorab: Bei Effektschwellen kann es sich um Dosen, Raten, Level oder Konzentrationen handeln. Dies in ToxRat einstellbar. Im vorliegenden Handbuch verwenden wir meist die auf Konzentrationen basierenden Bezeichnungen NOEC und ECx.

An dieser Stelle dürfen wir Ihnen Emily vorstellen:

Emily wird Sie auf Besonderheiten im Text aufmerksam machen.



In roter Ausstattung wird sie Ihnen besonders Wichtiges nahe bringen. Bitte diese Abschnitte auf jeden Fall gründlich lesen!



In Grün weist Emily auf Nützliches hin und gibt Tipps zum aktuellen Thema.



Emily in Blau schließlich informiert Sie tiefgehend über das, was in und mit ToxRat passiert – das sind die Abschnitte für die Benutzer, die sich auch für Hintergründe interessieren!

2 Vorwort: Was Sie über ToxRat wissen sollten

ToxRat ist speziell zugeschnitten für statistische Auswertungen in der Ökotoxikologie. Die integrierten Inhalte zahlreicher Biotest-Guidelines sowie das im Hintergrund verfügbare Expertenwissen in Sachen Statistik („wann welcher Test?“) machen die Besonderheit des Programms aus.

Um diese Eigenschaften nutzen zu können, müssen Sie Ihre Daten in mitgelieferte Vorlagen eingeben. Diese Datenvorlagen sind der Schlüssel zu ToxRat!

Die Verwendung der Datenvorlagen stellt sicher, dass stets ein geeignetes statistisches Verfahren angewendet wird und dass auch komplexe Biotests mit einem Klick in einer Art „Batch-Prozess“ (d.h. „in einem Rutsch“) ausgewertet werden können. Sie finden die komplette Liste aller mitgelieferten, auswertbaren Vorlagen in Kapitel 10.

Alle ToxRat-Programme bieten das gleiche Paket an statistischen Methoden und Verfahren. Alle erfüllen GLP-Anforderungen, enthalten ein Validierungsdokument und erstellen einen umfangreichen Report über die Ergebnisse. Die verschiedenen ToxRat-Programme unterscheiden sich lediglich durch Art und Umfang der mitgelieferten Vorlagen zur Dateneingabe und bieten somit unterschiedlichen Komfort.

ToxRat Standard enthält ausschließlich Datenvorlagen für manuelle Auswertungen.

ToxRat Monitor enthält Datenvorlagen für manuelle Auswertungen sowie zusätzlich solche für Biotests im Rahmen des Umweltmonitoring nach Din EN ISO (Umweltproben, Abwasseruntersuchungen, Verdünnungstests).

ToxRat Professional enthält zusätzlich zu den manuellen und ISO EN ISO-Datenvorlagen auch solche für Biotests nach OECD, IOBC und OPPTS.

ToxRat Professional XT enthält die gleichen Vorlagen wie Professional sowie zusätzlich ein Importmodul für Daten, die mit bestimmten Biotest-Automaten gewonnen wurden.

Wir beziehen uns in diesem Handbuch in der Regel auf den Lieferumfang von ToxRat Professional, denn die verwendeten statistischen Verfahren, die Menüs und Registerkarten und die grundsätzliche Bedienung sind in allen ToxRat-Varianten dieselben. An den Stellen, an denen eine Information nur für eine spezielle ToxRat-Variante gilt, wird darauf explizit hingewiesen.

2.1 Auswerte-Ebenen

Viele Biotests in der Ökotoxikologie werden gemäß bestimmter Richtlinien (Guidelines) durchgeführt, z.B. nach OECD oder DIN EN ISO. Dies ist das ToxRat -Spezialgebiet. Es wird umgesetzt durch mitgelieferte, Biotest-spezifische Datenvorlagen. Aber natürlich können Sie alle Biotest-Daten auch unabhängig von Biotestvorlagen auswerten – sei es, weil noch keine Richtlinie existiert oder weil die jeweilige Biotestvorlage nicht zum Lieferumfang Ihres ToxRat-Programms gehört. Für diese Fälle gibt es sogenannte Allgemeine Vorlagen (Generic Data Sets).

Entsprechend kennt ToxRat zwei verschiedene Auswerte-Ebenen:

Automatische Auswertungen vollständiger Biotests gemäß Richtlinie

- werden mit Hilfe spezifischer Biotest-Datenvorlagen durchgeführt. Darin sind - entsprechend der Vorgaben der betreffenden Test-Guideline - die Variablentypen, Messzeitpunkte, ökotoxikologischen Endpunkte und statistischen Verfahren bereits automatisch durch das Programm voreingestellt. Im Rahmen der Richtlinie können Sie diese Voreinstellungen optional ändern und durch Ihre eigenen Methodenauswahlen ersetzen. Die komplette Testsequenz einschließlich Berechnung abgeleiteter Variablen (Yield, Wachstumsrate) und Validitätsprüfung starten Sie mit einem einzigen Befehl.

Die entsprechenden Datenvorlagen gehören zum Lieferumfang, Sie können Sie anhand der Richtlinien- und Biotestbezeichnungen im Dateinamen leicht identifizieren.

Manuell gesteuerte, unspezifische Auswertungen

- werden mit Hilfe einfacher Datenvorlagen durchgeführt, die jeweils die Auswertung einer einzelnen Variable ermöglichen. *Sie wählen alle statistischen Methoden selbst aus und starten jede Auswertung manuell.* Das heißt, Sie müssen selbst entscheiden, ob die auszuwertende Variable quantaler oder metrischer Natur ist, ob die Daten repliziert vorliegen oder nicht und ob sie mehrere Messzeitpunkte benötigen. Es erfolgt keine Validitätsprüfung durch das Programm, abgeleitete Größen wie Yields und Wachstumsraten werden nicht automatisch berechnet. Jedoch gibt es auch bei den manuellen Auswertungen programmseitige Voreinstellungen, die Sie bei der Auswahl der geeigneten Methode unterstützen.

Sie können unter den mitgelieferten Vorlagen namens „*Generic data set metric responses*“ bzw. „*Generic data set quantal responses*“ eine geeignete Datenvorlage auswählen.

2.2 Daten-Vorlagen: Masterbooks und Workbooks

Die oben erwähnten Vorlagen zur Dateneingabe werden als sogenannte Masterbooks und Workbooks in Microsoft MS Excel ^{TM 1} kompatiblen Format (xlt, xls) mitgeliefert.

ToxRat verarbeitet grundsätzlich nur die MS Excel 2007-Formate xlt und xls. Bei einer möglichen Bearbeitung von ToxRat -Datenvorlagen mittels MS Excel (siehe Kapitel 3.4 und 3.5) müssen Sie deshalb unbedingt darauf achten, dieses Format beizubehalten (nicht xlsx!).

Alle Datenvorlagen können direkt in ToxRat ausgefüllt und bearbeitet werden, denn ToxRat enthält ein integriertes Tool zur Dateneingabe, den sogenannten Workbookdesigner. MS Excel *kann* zur Dateneingabe verwendet werden, *muss* aber nicht. Wichtig: Sämtliche Auswertungen werden ausschließlich ToxRat intern durchgeführt, ohne dass dazu MS Excel-Funktionen verwendet werden. Das heißt, ToxRat ist auf jedem Rechner mit Windows-Betriebssystem lauffähig, unabhängig davon, ob und in welcher Version MS Excel installiert ist.

Die grundsätzliche Handhabung von Masterbooks und Workbooks wird in Kapitel 3.3 ausführlich erläutert. Hier erhalten Sie vorab eine kurze Zusammenfassung des Wesentlichen.

Jede Datenvorlage besteht aus einem **Deckblatt** („General Notes“) und mindestens einem **Datenblatt** („InputRawData“).

Das Deckblatt enthält jeweils allgemeine Informationen über das aktuelle Projekt, die Testsubstanz, das Testsystem, ggfls. die ökotoxikologischen Endpunkte (NOEC, ECx, LID...), die Messvariable(n) usw.. Wenn es sich um ein Biotest-Workbook handelt, ist die Guideline-Bezeichnung vermerkt und wesentliche Informationen zum Testsystem sind voreingestellt. Die Inhalte des Deckblattes werden in den Ergebnisbericht der statistischen Auswertung übernommen.

Die Datenblätter dienen zur Eingabe der eigentlichen Versuchsdaten. Ihre Struktur folgt bestimmten Regeln, der genaue Aufbau hängt vom Datentyp ab.

Masterbooks sind leere Datenvorlagen im Format .xlt, in die Sie Ihre eigenen Versuchsdaten eingeben. Masterbooks dienen ausschließlich zur Dateneingabe, sie können nicht direkt mit ToxRat ausgewertet werden, sondern müssen erst in ein Workbook umgewandelt werden (dazu reicht allerdings ein Klick).

Workbooks sind ausgefüllte Masterbooks, die im Format .xls gespeichert wurden und damit bereit für die Auswertung in ToxRat sind. Das heißt, Workbooks dienen sowohl der Dateneingabe als auch der Auswertung. Bereits vorhandene Rohdaten in Workbooks können überschrieben und verändert werden. Nach der Auswertung enthalten Workbooks auch die Ergebnisse der statistischen Berechnungen in Form zusätzlicher Datenblätter (result tabs).

Ob Sie Ihre Daten lieber in leere Masterbooks eingeben, oder aber vorhandene Daten in Workbooks mit Ihren aktuellen Daten überschreiben, bleibt Ihnen überlassen.

¹ Im Folgenden bezeichnet als MS Excel

2.3 Statistische Auswertung

Die Vorgehensweise bei der statistischen Auswertung hängt von der verwendeten Datenvorlage ab. Einzelheiten finden Sie in Kapitel 4.

Haben Sie eine **Biotest-Datenvorlage** gewählt, starten Sie eine Komplettauswertung durch einen Klick auf den sogenannten RUN-Button. Dadurch werden alle in der Test-Guideline vorgeschriebenen statistischen Kenngrößen (EC_x, NOEC..) für alle vorgesehenen ökotoxikologischen Endpunkte (Messvariablen und abgeleitete Variablen wie Zuwachs (Yield) und Wachstumsrate (Growth Rate) berechnet sowie die erforderlichen Validitätskriterien berechnet und die Validität überprüft. Im Hintergrund verfügbare Grundeinstellungen (default settings) stellen sicher, dass in jedem Fall eine korrekte Auswertung erfolgt. Die default settings können Sie optional durch Ihre individuellen Einstellungen ersetzen.

Haben Sie eine **allgemeine Vorlage** der Art „Generic workbook“ gewählt, so starten Sie jede einzelne statistische Auswertung manuell über das Menü. Auch dabei stehen Ihnen programmseitige Empfehlungen zur Testauswahl und zu Test-Randbedingungen zur Verfügung.

Die grundsätzliche Richtigkeit der Programmberechnungen wird nachgewiesen im mitgelieferten Validierungsdokument. Im ersten Teil des Validierungsdokumentes werden die verwendeten mathematischen Algorithmen erläutert und ihre Ergebnisse mit denen aus der Literatur und aus unabhängigen Berechnungen mit MS Excel verglichen. Im zweiten Teil des Validierungsdokumentes werden Musterergebnisse für mitgelieferte Beispieldatensätze präsentiert, die Sie in Ihrer individuellen Konfiguration (Rechner, Betriebssystem usw.) nachvollziehen und reproduzieren können.

3 Es geht los - Eine Datei erstellen

Sie haben Ihre Daten erhoben und möchten sie nun auswerten. Entscheiden Sie zunächst, ob Biotestdaten nach einer bestimmten Richtlinie auszuwerten sind. Wenn ja, dann brauchen Sie keine weiteren Zwischenberechnungen vorzunehmen – statt dessen wählen Sie direkt die entsprechende Biotest-Datenvorlage, geben dort Ihre Rohdaten ein – alles weitere übernimmt ToxRat. Wenn nein, dann ermitteln Sie vorab unabhängig von ToxRat die Daten, die Sie statistisch auswerten wollen (Yields, Wachstumsraten...), aus den Rohdaten. Um sich mit dem Programm vertraut zu machen, können Sie anfangs die mitgelieferten Demo-Daten verwenden – so wie in diesem Handbuch.

3.1 Menüs und Buttons im Startbildschirm

Starten Sie das Programm mit Klick auf das ToxRat -Logo auf Ihrem Desktop.



Sie sehen dann diesen Bildschirm (wobei die Programmbezeichnung je nach ToxRat Variante variiert):

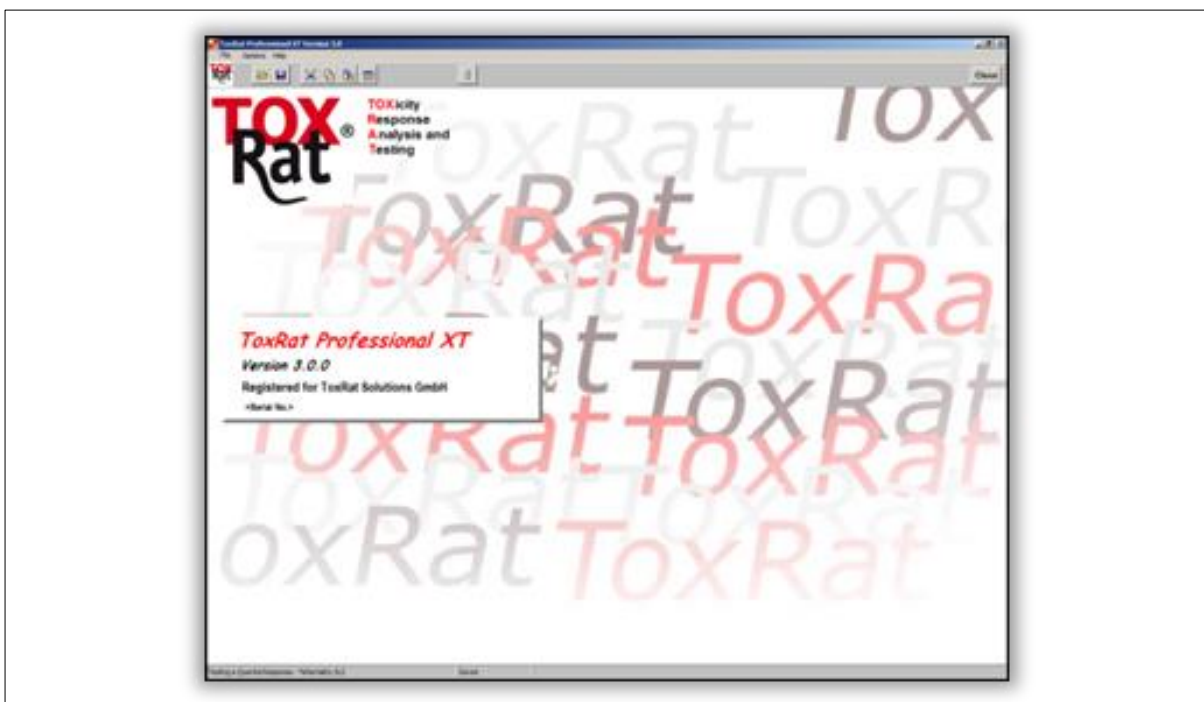


Abbildung 1: Startbildschirm

Die Befehle und Buttons in ToxRat sind Kontext spezifisch; Sie werden also – je nachdem, was Sie gerade tun – unterschiedliche Befehle und Buttons zur Verfügung haben. Im Startbildschirm sind es die Folgenden (Abbildung 2):

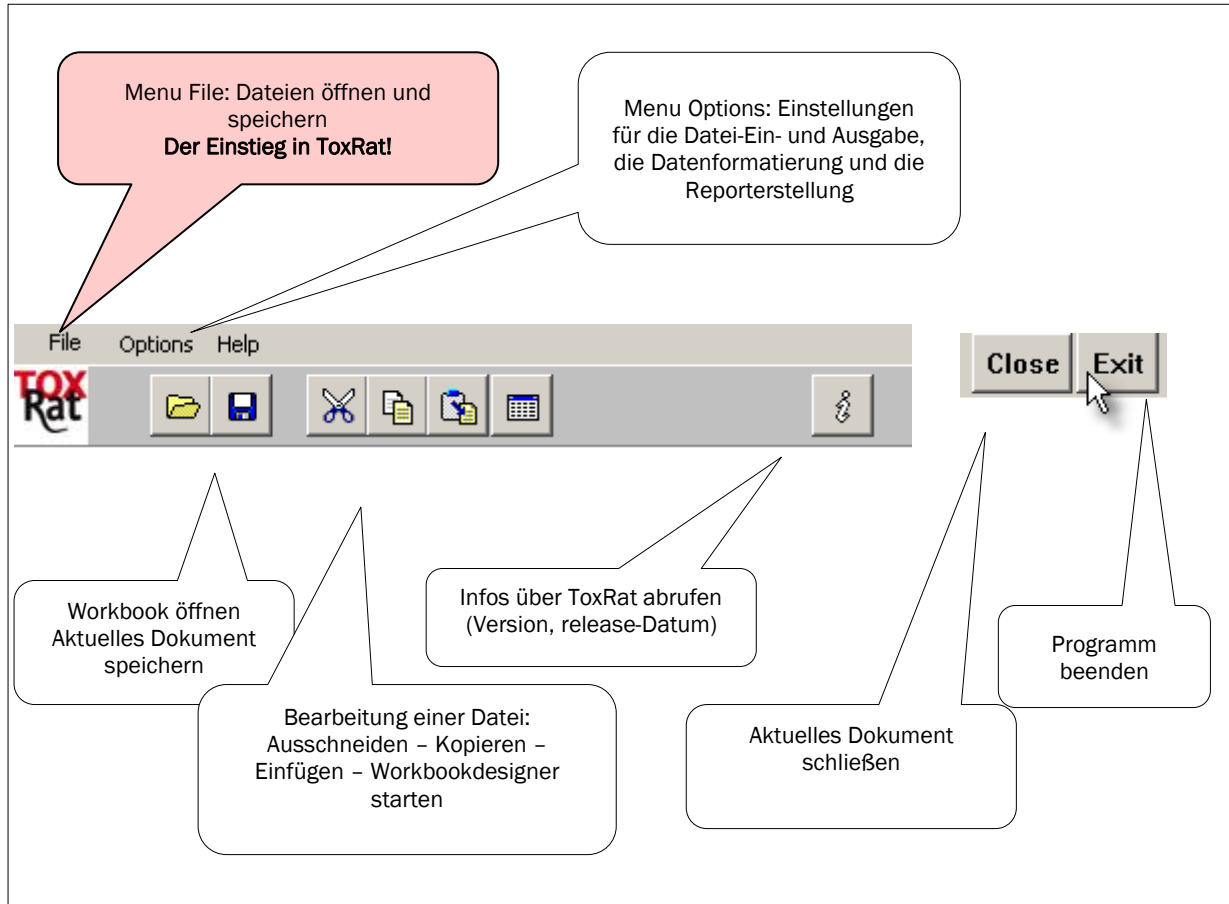


Abbildung 2: Menüpunkte und Buttons im Startbildschirm

Die Menüpunkte des Eröffnungsbildschirms sind *File* und *Options*.

Unter *Options* finden Sie eine Reihe nützlicher Einstellungen für die Datei-Ein- und Ausgabe, die Datenformatierung und die Reporterstellung. Diese werden im Einzelnen im jeweiligen Zusammenhang besprochen. Zu Beginn genügen die programmseitigen Voreinstellungen.



Um Ihre erste / überhaupt eine Auswertung zu starten, müssen Sie zunächst eine Datei erstellen bzw. öffnen, dazu benötigen Sie den Menüpunkt *File*.

3.2 Workbook oder Masterbook – Das ist hier die Frage!

Wir erinnern uns: Masterbooks sind leere Daten-Vorlagen, Workbooks enthalten bereits Daten, sind also sozusagen ausgefüllte Masterbooks.

Eine schnelle und einfache Möglichkeit, neue Daten in ToxRat einzugeben, besteht darin, ein entsprechendes Demo-Workbook (oder ein bereits vorhandenes eigenes Workbook) zu öffnen, die darin enthaltenen Daten zu überschreiben und das Ganze unter einem neuen Namen abzuspeichern (save as). Nicht benötigte Zellen können dabei leer bleiben. Diese Variante hat den Vorteil, dass bereits eine Datenstruktur vorgegeben ist, an der man sich orientieren kann.

Wenn Sie lieber leere Dateneingabe-Vorlagen ausfüllen, verwenden Sie stattdessen eins der mitgelieferten Masterbooks. Kontrollieren Sie in diesem Fall die erforderliche Datenstruktur ggfls. anhand eines entsprechenden Demo-Workbooks!

Im weiteren Verlauf dieses Handbuchs verwenden wir ausschließlich Workbooks und demonstrieren die weiteren Schritte anhand von Demo-Workbooks aus dem Lieferumfang des Programms. Die folgenden Erläuterungen gelten aber für den Umgang mit Masterbooks sinngemäß.



Sollten Sie einmal bestimmte Dateien im Öffnen-Dialog nicht finden können – prüfen Sie bitte, ob Sie möglicherweise die Befehle „New Masterbook“ und „File-open“ vertauscht haben. Bei „New masterbook“ bietet ToxRat Ihnen ausschließlich Files mit der Endung xlt an – d.h. Workbooks mit der Endung xls werden im AuswahlMenü nicht angezeigt!

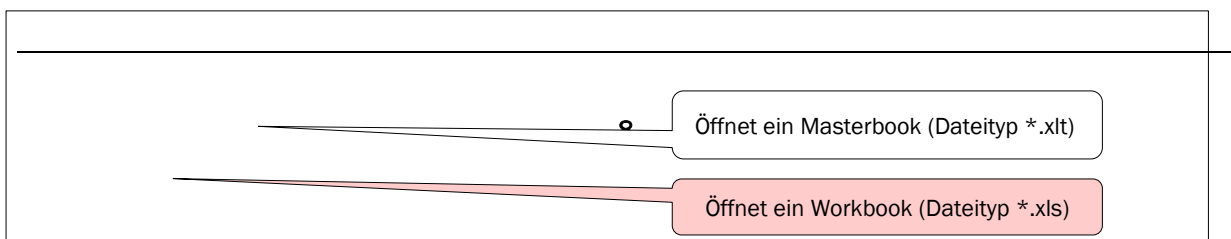


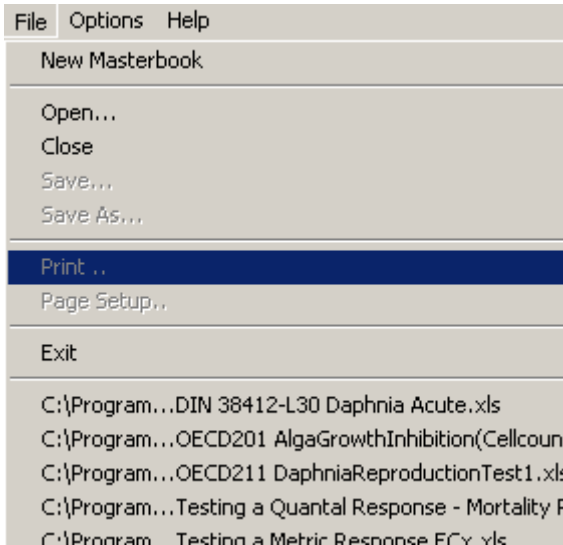
Alle Datenvorlagen können direkt in ToxRat ausgefüllt und bearbeitet werden (integriertes Tool zur Dateneingabe). MS Excel ist dazu nicht erforderlich. Insbesondere sämtliche Auswertungen werden ausschließlich ToxRat intern durchgeführt, ohne dass dazu MS Excel-Funktionen verwendet werden. Das heißt, ToxRat ist auf jedem Rechner mit Windows-Betriebssystem lauffähig, unabhängig davon, ob und in welcher Version MS Excel installiert ist.

3.3 Datenvorlage öffnen

Um Ihre Daten in ToxRat bekannt zu machen, laden Sie zunächst eine Datenvorlage über das Menü File (Abbildung 3).

Bitte beachten Sie: Es kann immer nur eine Datei in ToxRat geöffnet sein. Sobald Sie eine andere Datei öffnen, wird die aktive Datei geschlossen. Vorher fragt ToxRat, ob Sie die aktive Datei speichern wollen. Gespeichert wird unter dem aktuellen Dateinamen. Möchten Sie den Dateinamen ändern, benutzen Sie die „save as“ Funktion.





Zuletzt geöffnete Workbooks, für direkten Zugang, per Klick zu öffnen

Abbildung 3: „File“ im Eröffnungsbildschirm

Wählen Sie den Menüpunkt file-open. In der sich öffnenden Dialogbox werden alle mitgelieferten Demo-Workbooks angeboten, sortiert in verschiedene Ordner (falls nicht: aktivieren Sie unter dem Menüpunkt Options - Input/Output das Kontrollkästchen „Switch Workbookpath to Demopath“).



Wenn Sie zu einem späteren Zeitpunkt ein Workbook aus einem anderen als dem Demo-Ordner öffnen wollen (z.B. eine Ihrer eigenen Dateien), so können sie in der geöffneten Dialogbox durch die Verzeichnisstruktur Ihres Rechners navigieren, indem Sie auf den kleinen Pfeil im Suchen-Fenster klicken. Das Verzeichnis, in dem ToxRat standardmäßig zuerst sucht, lässt sich außerdem unter Options Input/Output dauerhaft einstellen (Directories, Workbooks). Die Standard-Voreinstellung ist das mitgelieferte Demo-Verzeichnis.

In ToxRat Professional und ToxRat Professional ProXT sehen Sie nun das folgende Fenster (Abbildung 4).

In ToxRat Monitor fehlen die Ordner OECD, IOBC und OPPTS, in ToxRat Standard fehlen alle Guideline-Ordner, d.h. dort sehen Sie an dieser Stelle nur die beiden Ordner „Generic Data Sets Metric responses“ und „Generic Data Sets Quantal Responses“.

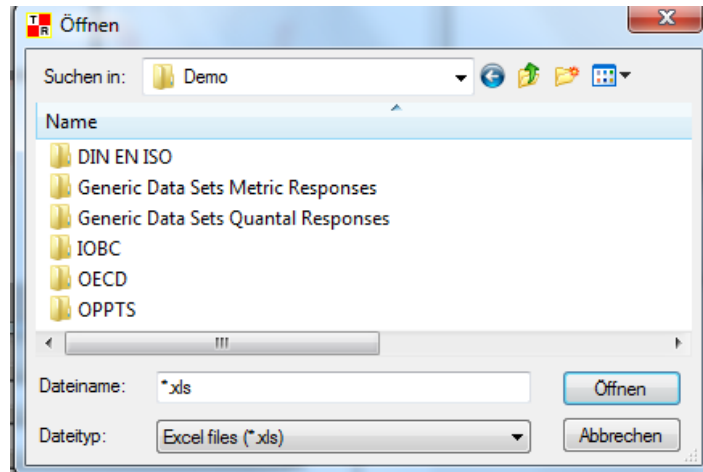


Abbildung 4: Dialogfenster „File - open“

Für Anwender von ToxRat Professional und ToxRat Professional Pro XT:
Wählen Sie den Ordner OECD, darin den Unterordner „Substances“. Sie sehen nun eine Liste aller verfügbaren Datenvorlagen für die Auswertung von Biotests nach OECD-Richtlinien. Wählen Sie Sie das Workbook *OECD 210 Fish Early Life Stage 2013.xls* und klicken Sie auf „Öffnen“. Dieser Datensatz wird uns ab nun als Beispiel begleiten.

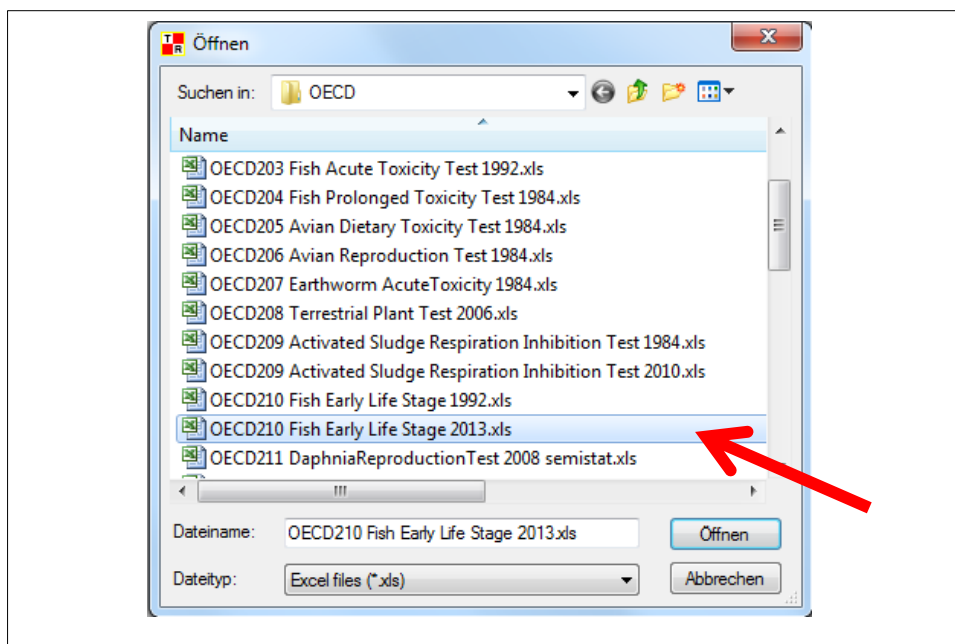


Abbildung 5: Dialogfenster File – open – Order Demo / OECD / Substances

Wenn Sie ToxRat Monitor verwenden, öffnen Sie bitte das Workbook *DIN EN ISO 15088 2009 Acute Toxicity of Wate Water to Eggs of Danio rerio.xls* aus dem Verzeichnis DIN EN ISO / Water Quality.

Wenn Sie ToxRat Standard verwenden, öffnen Sie bitte das Workbook *Testing a Quantal Response 3 – Mortality replicated and at several Intervals.xls*.

Die folgenden Abschnitte gelten sinngemäß auch für diese Dateien. Auf Besonderheiten für ToxRat Standard und ToxRat Monitor wird jeweils hingewiesen.

3.3.1 Die Struktur von Workbooks und Masterbooks

Ihr Bildschirm sieht nun so oder so ähnlich aus wie in Abbildung 6:

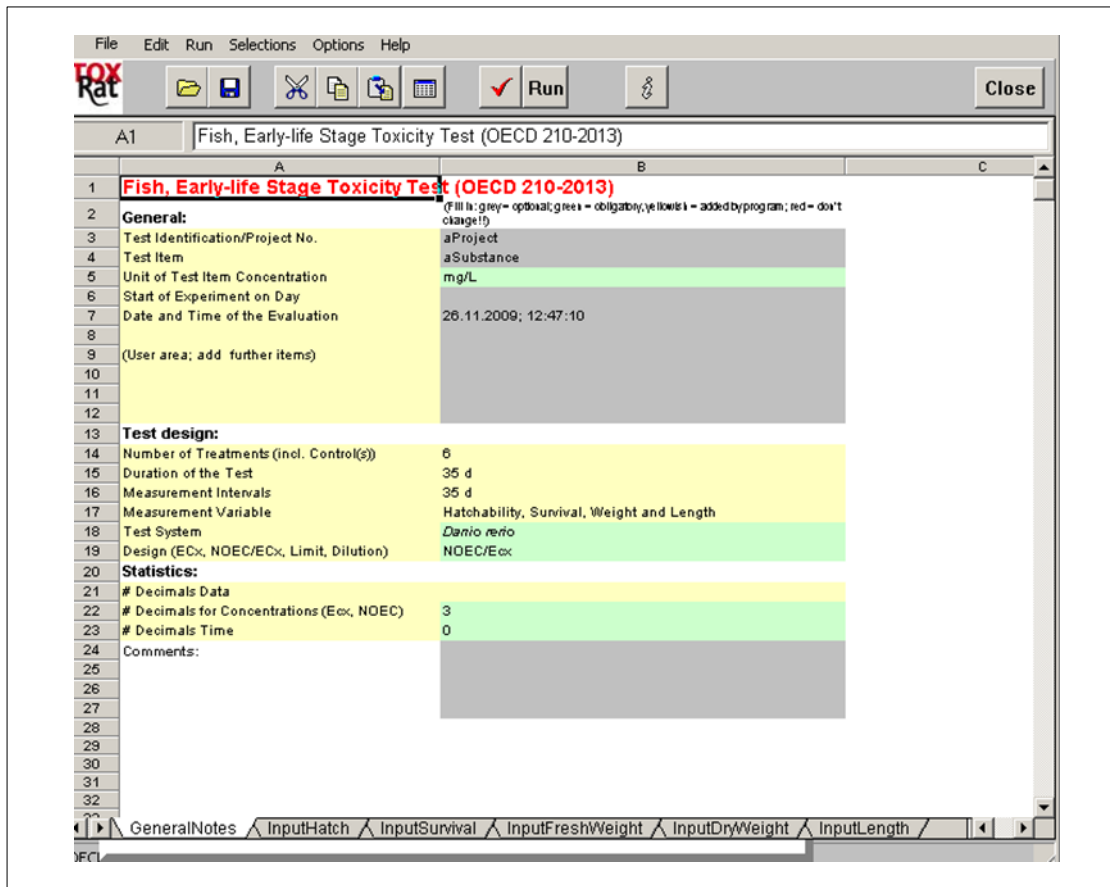


Abbildung 6: Deckblatt eines Biotest-Workbooks

Es sind einige Menüpunkte und Buttons hinzugekommen, die für die Auswertung von Bedeutung sind – diese werden in Kapitel 4.1, „Menüs und Buttons im Auswertebildschirm“, erläutert.

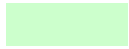
Wir sehen uns zunächst die Struktur des geöffneten Workbooks an – sie entspricht dem Aufbau von MS Excel-Dateien.

Jedes Workbook enthält ein Deckblatt „General Notes“ und ein oder mehrere Datenblätter (Input-sheets). Sie können zwischen den einzelnen Seiten hin und her blättern, indem Sie auf die Registerkarten am unteren Bildschirmrand klicken.



Bezeichnung, Reihenfolge und Anzahl der Datenblätter (Input Sheets) eines Workbooks dürfen keinesfalls geändert werden.

Gemeinsam ist allen Seiten die Farbcodierung:



In die grünen Zellen geben Sie Ihre Messdaten ein. Nicht benötigte grüne Zellen können auch leer bleiben.



In die grauen Zellen können Sie erläuternde Kommentare schreiben – sie können auch leer bleiben.



Gelbe Zellen werden ausschließlich vom Programm beschrieben.



Rote Texte enthalten Schlüsselzeichen, die den Programmablauf steuern, sie dürfen deshalb keinesfalls verändert werden.

3.3.2 Das Deckblatt (General Notes)

Das Deckblatt (General Notes) enthält allgemeine Informationen über das aktuelle Projekt, die Testsubstanz, den Test-Organismus, das Testdesign (Anzahl Behandlungen, Testdauer) und die Messvariable(n). In General Notes wird außerdem festgelegt, welche statistischen Endpunkte bestimmt werden und mit wie vielen Dezimalstellen die berechneten ECx- und NOEC-Konzentrationen dargestellt werden sollen. Die Zeilen 3-19 des Deckblattes werden in den Ergebnisbericht (Report) der statistischen Auswertung übernommen.



Nur grüne und graue Zellen dürfen vom Benutzer ausgefüllt werden. In „General Notes“ dürfen keine Zellen hinzugefügt werden.

Die **Biotest-Workbooks** sind nach Testguideline sortiert (DIN EN ISO, OECD, IOBC, OPPTS). In Zelle A1 des Deckblattes ist die Guideline-Bezeichnung vermerkt, wesentliche Informationen zum Testsystem und zur statistischen Auswertung sind voreingestellt. Unsere Beispiele:

ToxRat Professional: siehe Workbook OECD210, Blatt General Notes

ToxRat Monitor: siehe Workbook *Din EN ISO 15088*, Blatt General Notes.

ToxRat Standard: enthält keine Biotest-Workbooks, bitte fahren Sie fort bei „Generic Data Workbooks“

Die Zeilen 14, 15 und 16 (Number of Treatments, Duration of Test, Measurement Intervals) werden vom Programm nach dem Einlesen automatisch entsprechend der Datenstruktur in den Datenblättern aktualisiert.

- B5 Unit of Test Item Concentration: i.d.R. Konzentration oder Dosis; bei Verdünnungstests Volumenprozent (% Vol/Vol), in diesem Fall Angabe der Testansätze als Verdünnungsstufen („1:2“)
- B17 Measurement Variable: Hier sind die Variablen gelistet, deren Daten in das Workbook eingetragen werden können (nicht müssen – einzelne Datenblätter können auch ganz leer bleiben). Die Zuordnung des Variablentyps (quantal / metrisch) und damit die Auswahl der geeigneten statistischen Methoden übernimmt ToxRat für Sie. Der Inhalt dieser Zelle darf nicht verändert werden.
- B18 Test System Der übliche Testorganismus laut Test-Guideline ist voreingestellt. Wenn ein anderer Organismus verwendet wurde, kann dies hier eingetragen werden (Wichtig, wenn laut Guideline verschiedene Validitätskriterien für unterschiedliche Organismen gelten, z.B. OECD 201 oder OECD 206)
- B19 Design Der Eintrag in dieser Zelle steuert Art und Umfang der automatischen statistischen Auswertung durch ToxRat. Voreingestellt sind diejenigen Endpunkte, die standardmäßig laut Guideline gefordert sind. In der Regel muss das voreingestellte Design nicht verändert werden. Falls doch erforderlich:
ECx: ToxRat berechnet ausschließlich Effekt-Konzentrationen. NOEC/ECx: ToxRat berechnet Schwellen-Konzentrationen und Effekt-Konzentrationen, Limit: ToxRat führt paarweise Vergleiche durch (Limit Test), Dilution: ToxRat berechnet die LID (Lowest Ineffective Dilution, nur sinnvoll bei Verdünnungstests nach DIN EN ISO).
- B22 und B23 Decimals legt die Anzahl der angezeigten Dezimalstellen für die Angabe von ECx und NOEC-Konzentrationen, Testkonzentrationen und Messzeitpunkten fest (Näheres siehe Kapitel 6.4.2).

Die „Generic Data Workbooks“ gibt es in zwei grundsätzlichen Varianten: Generic Data Sets Quantal Responses (für quantale Variablen) und Generic Data Sets Metric Responses (für metrische Variablen).

Öffnen Sie bitte nacheinander folgende Beispieldateien (alle ToxRat Varianten):
Testing a Quantal response 3 – Mortality replicated and at several Intervals.xls
Testing a Metric response 4 at several Intervals.xls



Quantale Variablen sind Messwerte, die in Form von diskreten Kategorien oder Zuständen erfasst werden. Ihr Wert ist dimensionslos. Sie können stets in Form eines „Anteils (Quantum) einer Grundmenge“ ausgedrückt werden. Typische Beispiele aus der Ökotoxikologie sind Lebend – Tot (Anzahl Überlebender von x Eingesetzten), Geschlüpft - nicht Geschlüpft (Anzahl Geschlüpfter von x Eingesetzten).

Metrische Variablen sind Messwerte, die in Abhängigkeit von der Messgenauigkeit beliebig genau erfasst werden können, d.h. sie sind kontinuierlicher Natur. Sie haben eine bestimmte Dimension. Typische Beispiele aus der Ökotoxikologie sind Gewichte, Längen, Stoffwechselraten.

Anzahlen wie „Zellzahlen“ oder „Anzahl Nachkommen“ können wie metrische Variablen ausgewertet werden, sofern es keinen Maximalwert gibt. D.h. die Anzahl Nachkommen im Daphnien-Reproduktionstest (OECD 211) ist metrisch, hingegen ist die Anzahl geschlüpfter Larven im Fischeitest (OECD 210) quantaler Natur, da vorher eine bestimmte Anzahl Eier eingesetzt wurden.

In Zelle A1 des Deckblattes ist vermerkt, ob es sich um ein Workbook für eine quantale oder eine metrische Variable handelt. Je nach verwendetem Workbook wendet ToxRat andere statistischen Methoden an. Auch die Struktur für die Dateneingabe unterscheidet sich je nach Variablentyp. Deshalb hängt die grundsätzliche Richtigkeit der Berechnungen entscheidend davon ab, dass Sie die richtige Datenvorlage gewählt haben!



Bei der Verwendung eines Generic Data-Workbooks liegt es in Ihrer Verantwortung, den Typ der auszuwertenden Variable korrekt zu charakterisieren und das richtige Workbook (quantal oder metrisch) auszuwählen.

Mit einem Generic Data-Workbook können Sie immer nur eine Variable auswerten. Zur Bedeutung der Zellen im Deckblatt siehe Biotest-Workbooks, mit folgenden Ausnahmen:

B17 Measurement Variable: Generic Data Quantal Responses: Mögliche Variablen sind Mortality, Survival und Emergence. Je nach Variable sind in den Dateneingabeblättern bestimmte Schlüsselbegriffe erforderlich – diese sind voreingestellt, wenn sie eine entsprechende Vorlage gewählt haben (siehe Dateinamen).

Generic Data Metric Responses:

Sie können den Variablennamen selbst festlegen, es ist jegliche metrische Variable möglich. Die hier eingetragene Bezeichnung, z.B. „Gewicht“ oder „Länge“ wird in den Ergebnistabellen der späteren Auswertungen genannt („Result of the Probit analysis with <variablenname>...“).

B18 Test System

Hier wird der verwendete Testorganismus eingetragen. Frei wählbar durch Sie, wird vom Programm nicht weiter verwendet, nur berichtet.

B19 Test Design

Zellbezeichnung nicht vorhanden, keine Eintragung möglich – Auswahl der statistischen Endpunkte erfolgt manuell.

3.3.3 Die Datenblätter (Input Raw Data)

Die Datenblätter eines Workbooks dienen zur Eingabe der eigentlichen Versuchsdaten.

Wenn es sich um ein Biotest-Workbook handelt, ist ihre Bezeichnung und Anzahl Biotest-spezifisch, d.h. beim Algenwachstumstest nach OECD 201 werden Zellzahlen (bzw. Extinktionen oder Fluoreszenzen) erwartet, beim Daphnien Reproduktionstest nach OECD 211 ist die Eingabe von Nachkommenzahlen vorgesehen, beim Fish Early Life Stage Test nach OECD 210 gibt es Datenblätter für Schlupf, Überleben, Gewicht und Länge, usw. Probieren Sie es einfach mit verschiedenen Demo-Dateien aus!

Mit den Biotest-Workbooks können Sie somit sowohl mehrere Variablen als auch verschiedene Variablentypen (quantal / metrisch) gleichzeitig auswerten. Die Zuordnung quantal / metrisch nimmt ToxRat Ihnen dabei automatisch ab - und damit die Verantwortung für die Auswahl der passenden statistischen Methoden.

Wenn es sich um ein Generic Data Workbook handelt, können Sie nur Daten für eine einzelne Variable eingeben, für deren Auswahl und Bezeichnung gelten bestimmte Regeln, siehe oben, Erläuterung zu Zelle B17.

Unabhängig vom Workbook- und Variablentyp gelten für die Datenblätter generell bestimmte Regeln für die Anordnung von Behandlungen, Replikaten und Messzeitpunkten:

Die Testansätze / Behandlungen (Konzentrationen, Dosierungen oder Verdünnungsstufen...) sind vertikal in Spalten angeordnet und stets aufsteigend einzutragen. D.h. in der ersten Spalte steht die Kontrolle, danach ggfls. Lösungsmittelkontrolle (falls vorhanden), dann Testansätze in steigender Konzentration. Diese Anordnung der Testansätze muss zwingend eingehalten werden.

Optional kann in die letzte Spalte eine Positivkontrolle bzw. ein externer Standard eingetragen werden – diese Spalte muss dann mit einem Namen bezeichnet sein statt mit einer Konzentration oder Verdünnungsstufe (z.B. „Pos.Control“), dadurch bezieht ToxRat sie in die statistischen Auswertungen nicht mit ein (kann für NOEC Bestimmung jedoch optional zugewählt werden, siehe Kapitel 4.4).

Replikate und Messzeitpunkte sind horizontal angeordnet, d.h. in Zeilen. Sind mehrere Messzeitpunkte vorhanden, werden die Replikate eines Messzeitpunktes blockweise zusammengefasst.



Aufbau eines Datenblatts für quantale Daten

Unsere Beispieldateien sind:

ToxRat Professional: Workbook OECD210, Blatt Input Hatch

ToxRat Monitor: Workbook Din EN ISO 15088, Blatt InputRawData. Erfasst werden die Anzahl der Eingesetzten und die Anzahl der Toten. Wichtig: da es sich um einen Abwassertest handelt, sind die Behandlungen als Verdünnungsstufen angegeben. Für die Ermittlung von EC-Werten rechnet ToxRat diese in Volumen-Prozent-Anteile um (%Vol/Vol).
 ToxRat Standard: Workbook Testing a Quantal response 3 – Mortality replicated and at several Intervals.xls, Blatt InputRawData. Erfasst werden die Anzahl der Eingesetzten und die Anzahl der Toten.

Da bei quantalen Daten (Abbildung 7) grundsätzlich Anteile ermittelt werden, müssen Sie stets Daten für mindestens zwei Messzeitpunkte eingeben: Startzahlen zu Versuchsbeginn und beobachtete Zahlen zu dem Messzeitpunkt, für den die statistische Auswertung erfolgen soll. In den Biotest-Workbooks sind die vorgesehenen Messzeitpunkte gemäß Guideline voreingestellt, Sie können sie jedoch editieren. Auch wichtig: 2 von 10 Organismen sind statistisch nicht dasselbe wie 20 von 100 Organismen. Deshalb müssen Sie hier unbedingt Absolutzahlen eintragen!

The screenshot shows an Excel spreadsheet with the following data structure:

1	Raw Data	Egg Hatchability	
2	Time	Treatment	
3	0,0 d	Control	1,5
4	1	20	20
5	2	20	20
6	3	20	20
7	4	20	20
8	#Replicates	4	4
9	#Introduced	80,00	80,00
10	3,0 d		
11	1	18	16
12	2	19	16
13	3	18	15
14	4	19	15
15	#Replicates	4	4
16	#Hatched	74,00	62,00
17	6,0 d		
18	1	19	16
19	2	19	18
20	3	19	17
21	4	19	17
22	#Replicates	4	4
23	#Hatched	76,00	70,00

Callouts and their content:

- Messzeitpunkt, in Tagen ([d], Stunden [h] oder Wochen [wks]; Startzeitpunkt erforderlich als Bezugsgröße für Anteilsbestimmung** (points to '0,0 d')
- In Spalten: Testansätze, Konzentrationen aufsteigend sortiert** (points to 'Control' and '1,5')
- In Zeilen: Replikate nicht benötigte Zellen können leer bleiben** (points to empty cells in rows 4-7)
- Automatische Bestimmung von Replikatzahl und Summe durch Formelbezug in Zellen** (points to '#Replicates' and '#Introduced')
- Wichtige programinterne Steuerzeichen (#) – und Begriffe – nicht verändern!** (points to '#Replicates' and '#Hatched')
- Im ersten Datenblock: Startzahl (Introduced) zu Testbeginn. Eingegeben werden Absolutzahlen** (points to '80,00')
- In den folgenden Datenblöcken: beobachtete Absolutzahlen an verschiedenen Messzeitpunkten** (points to '18', '19', '18', '19')

Abbildung 7: Datenblatt (InputRawData) eines Workbooks – Quantale Daten

Aufbau eines Datenblatts für metrische Daten:

Unsere Beispieldateien:

ToxRat Professional: siehe Workbook OECD210, Blatt Input Fresh Weight.

ToxRat Monitor und ToxRat Standard: siehe Workbook Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls, Blatt InputRawData. Beispiel Zellzahlen.

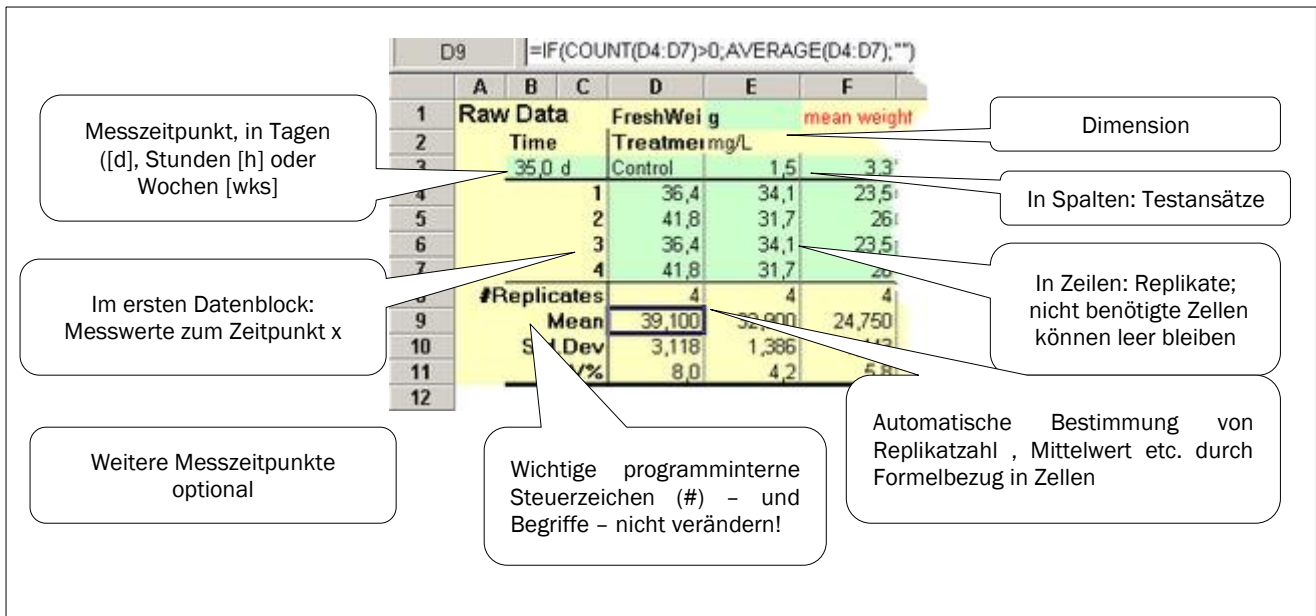


Abbildung 8: Datenblatt (InputRawData) eines Workbooks – Metrische Daten

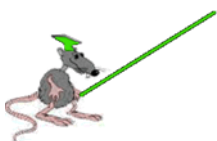
Bei metrischen Daten (Abbildung 8) ist die Anzahl der Messzeitpunkte flexibel: Die Auswertung der Originalvariable erfolgt grundsätzlich für jeden vorhandenen Messzeitpunkt, egal ob es nur einer ist oder es mehrere sind.

Wenn die Guideline die Berechnung abgeleiteter Größen wie Yields oder Wachstumsraten vorsieht, so sind dafür in den Biotest-Workbooks mindestens zwei Messzeitpunkte gemäß Guideline voreingestellt, Sie können sie jedoch editieren. Ob für eine Variable auch abgeleitete Größen berechnet werden, ist je nach Vorgabe in der entsprechenden Testguideline programmseitig festgelegt.

In den Generic Data Workbooks werden grundsätzlich nur die Originalwerte der eingetragenen Daten ausgewertet. Falls Yields, Wachstumsraten oder andere abgeleitete Größen statistisch ausgewertet werden sollen, müssen Sie diese selbst berechnen und die Ergebnisse als neue Variable in ein entsprechendes Workbook eingeben.

Falls Replikate vorhanden sind, so werden aus diesen in den Datenblättern Summen gebildet (quantale Daten) bzw. Mittelwerte, und Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet (metrische Daten). Diese Berechnungen erfolgen unabhängig von den späteren statistischen Auswertungen durch Formelbezüge in den entsprechenden Zellen. Bei der eigentlichen statistischen Auswertung durch ToxRat werden alle Berechnungen programmintern neu ausgeführt.

Die Formelbezüge in den Dateneingabeblättern haben somit keine Auswirkungen auf die statistischen Berechnungen, sie dienen lediglich dazu, Ihnen schon bei der Dateneingabe einen ersten Überblick über mögliche Tendenzen zu verschaffen.

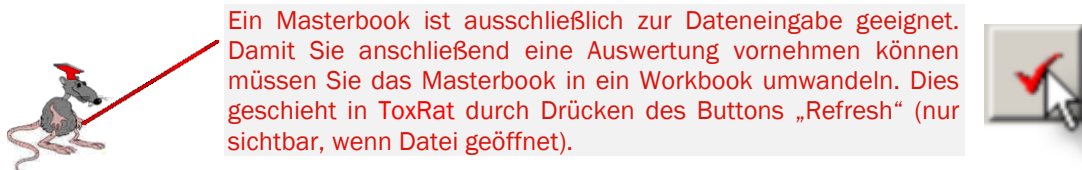


3.4 Dateneingabe in Workbooks und Masterbooks

Sie haben nun die grundsätzliche Struktur der Dateneingabe-Vorlagen kennen gelernt. Jetzt steht der Auswertung Ihrer eigenen Daten nichts mehr im Wege - Sie müssen sie lediglich noch in eine Datei eingeben. Dazu gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

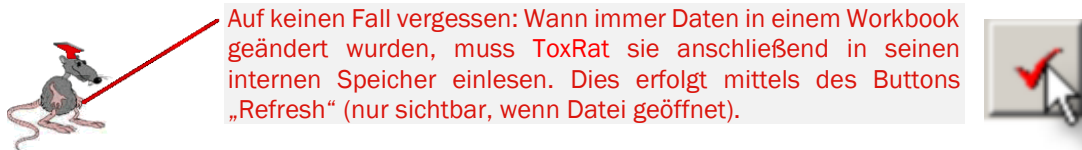
- Eingeben der Daten innerhalb von ToxRat
- Eingeben von Daten mittels MS Excel

Diese Möglichkeiten gelten sowohl für Masterbooks als auch für Workbooks, jedoch beachten Sie bitte Folgendes:



Ein Masterbook ist ausschließlich zur Dateneingabe geeignet. Damit Sie anschließend eine Auswertung vornehmen können müssen Sie das Masterbook in ein Workbook umwandeln. Dies geschieht in ToxRat durch Drücken des Buttons „Refresh“ (nur sichtbar, wenn Datei geöffnet).

Und falls Sie sich für die Dateneingabe in ein Workbook entschieden haben:



Auf keinen Fall vergessen: Wann immer Daten in einem Workbook geändert wurden, muss ToxRat sie anschließend in seinen internen Speicher einlesen. Dies erfolgt mittels des Buttons „Refresh“ (nur sichtbar, wenn Datei geöffnet).

In jedem Fall sollten Sie Ihre neu eingegebenen Daten abspeichern – dazu stehen Ihnen im File die Punkte „save“ und „save as“ zur Verfügung.

Achtung: „Save“ überschreibt eine bereits vorhandene Datei mit gleichem Dateinamen ohne Rückfrage! „Save as“ fragt nach einem neuen Dateinamen und speichert die Datei unter neuem Dateinamen und ggfls an anderem Speicherort ab. Zu den voreingestellten oder empfohlenen Speicherorten lesen Sie bitte Kapitel 9 „Installation“, siehe Abb. Abbildung 107.

Eingeben der Daten innerhalb von ToxRat

Geben Sie Ihre Daten direkt in die entsprechenden grünen Zellen ein. Bereits vorhandene Einträge können Sie einfach überschreiben. Bei einigen Biotests gibt es bestimmte Konventionen, wie fehlende Daten zu codieren sind (z.B. durch eine „-1“) – dies ist dann in dem jeweiligen Biotest-Workbook erläutert. Ansonsten lassen Sie die entsprechenden Zellen bei fehlenden Daten in der Regel einfach leer.

Sie können die copy und paste Befehle (Menü Edit oder Buttons oder rechte Maustaste) verwenden, um z.B. größere Blöcke gleicher Werte einzugeben. Allerdings werden dabei immer die Zellformatierungen mit kopiert – das kann optisch störend sein.

Deshalb gibt es den Workbookdesigner – das ist ein in ToxRat integriertes Tool, welches ähnliche Formatierungsmöglichkeiten bietet wie MS Excel und das es ermöglicht, ToxRat gänzlich unabhängig von MS Excel zu verwenden. Einzelheiten zum Aufruf und zur Bedienung erklären wir im folgenden Abschnitt: „Editieren von Workbooks und Masterbooks – der Workbookdesigner“.

Eingeben von Daten mittels MS Excel

Wenn Ihre Daten bereits in einer MS Excel-Datei vorliegen, spart es möglicherweise Eintipp-Arbeit, sie in eine ToxRat -Datei zu kopieren. Dies ist grundsätzlich über die Zwischenablage möglich. Dabei werden jedoch Zellformatierungen überschrieben (z.B. Farbcodierungen) und die Zellen sind anschließend gesperrt. Sie können dies vermeiden, indem Sie diese Arbeiten innerhalb von MS Excel durchführen, d.h. indem Sie Ihr ToxRat -Workbook oder Masterbook parallel zur MS Excel-Quell-Datei in MS Excel öffnen und die Daten unter Verwendung des MS Excel-Befehls „Einfügen „Nur Werte“ von der einen in die andere Datei kopieren. Das fertig ausgefüllte ToxRat -Workbook speichern Sie dann als xls-File ab und öffnen es zur statistischen Auswertung in ToxRat.



ToxRat verarbeitet grundsätzlich nur die MS Excel 2007-Formate xlt und xls. Bei einer möglichen Bearbeitung von ToxRat -Datenvorlagen mittels MS Excel achten Sie deshalb unbedingt darauf, dieses Format beizubehalten (nicht.xlsx!).

3.5 Editieren von Workbooks und Masterbooks – der Workbookdesigner

Und wenn die vorgegebene Anzahl Behandlungen, Replikate oder Messzeitpunkte in der Datenvorlage nicht passt? Natürlich können Sie die mitgelieferten Vorlagen an Ihr individuelles Testdesign anpassen. In diesem Kapitel erfahren Sie, wie das geht.

Ehe Sie loslegen: Nicht benötigte Zeilen für Replikate und Messzeitpunkte sowie überzählige Spalten für Testansätze in einem Workbook oder Masterbook können einfach leer bleiben. Sie müssen sie also nicht löschen – es genügt, wenn Sie die möglicherweise darin enthaltenen Daten löschen. Wichtig: Vorhandene Daten müssen stets im Block stehen, d.h. ohne leere Messzeitpunkte oder Behandlungen dazwischen, denn die Einlese-Routine interpretiert leere Spalten und Zeilen als Datensatzende. Die mitgelieferten Vorlagen sind in der Regel „überdimensioniert“ – sie können also auch für Testdesigns mit weniger Replikaten und Testansätzen verwendet werden.

Aber natürlich können die mitgelieferten Vorlagen nicht alle denkbaren Testdesigns abdecken. In diesen Fällen können Replikate, Messzeitpunkte und Testansätze hinzugefügt werden.



Was auch immer Sie tun: Änderungen dürfen Sie ausschließlich für die Datenblätter (RawDataSheets) eines Workbooks oder Masterbooks vornehmen. Im Deckblatt (General Notes) dürfen weder Zellen gelöscht noch welche hinzugefügt werden!

Analog zur Dateneingabe gibt es auch für das Editieren von Workbooks und Masterbooks grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

- Editieren von Vorlagen innerhalb von ToxRat
- Editieren von Vorlagen mittels MS Excel

Gleich, mit welchem Werkzeug Sie arbeiten, es gilt: Für die gelben Zellen der Datenblätter sind Formeln hinterlegt, die nicht versehentlich geändert werden dürfen. Deshalb sind die Datenblätter geschützt.



Um ein Masterbook oder Workbook an Ihr Testdesign anzupassen, müssen Sie den Blattschutz aufheben.

Zum Lieferumfang von ToxRat gehört der sogenannte Workbookdesigner – ein Tool, welches ähnliche Formatierungsmöglichkeiten bietet wie MS Excel.

Der Workbookdesigner starten Sie über das Menü Edit oder direkt durch den entsprechenden Button (Abbildung 9):

:

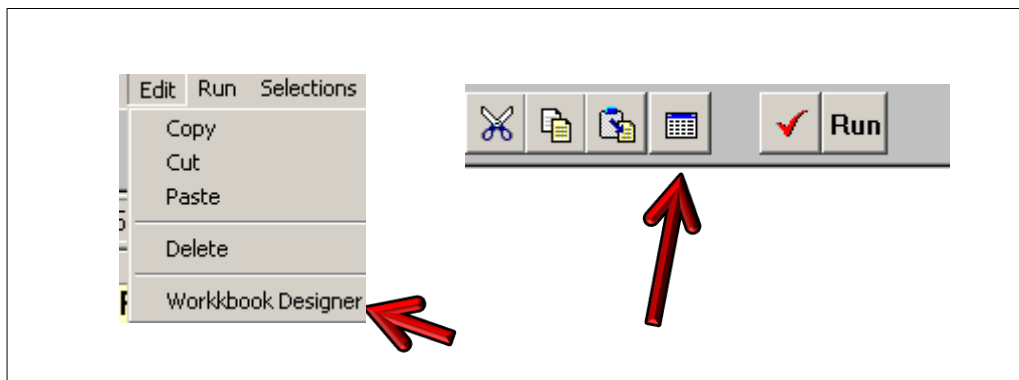


Abbildung 9: Aufruf des integrierten Workbookdesigners

Der Workbookdesigner öffnet die aktuelle Datei in einem eigenen Fenster (Abbildung 10) und stellt eine Reihe von Befehlen zum Kopieren, Löschen und Einfügen von Zellen und Zellinhalten zur Verfügung, wie sie aus MS Excel bekannt sind.

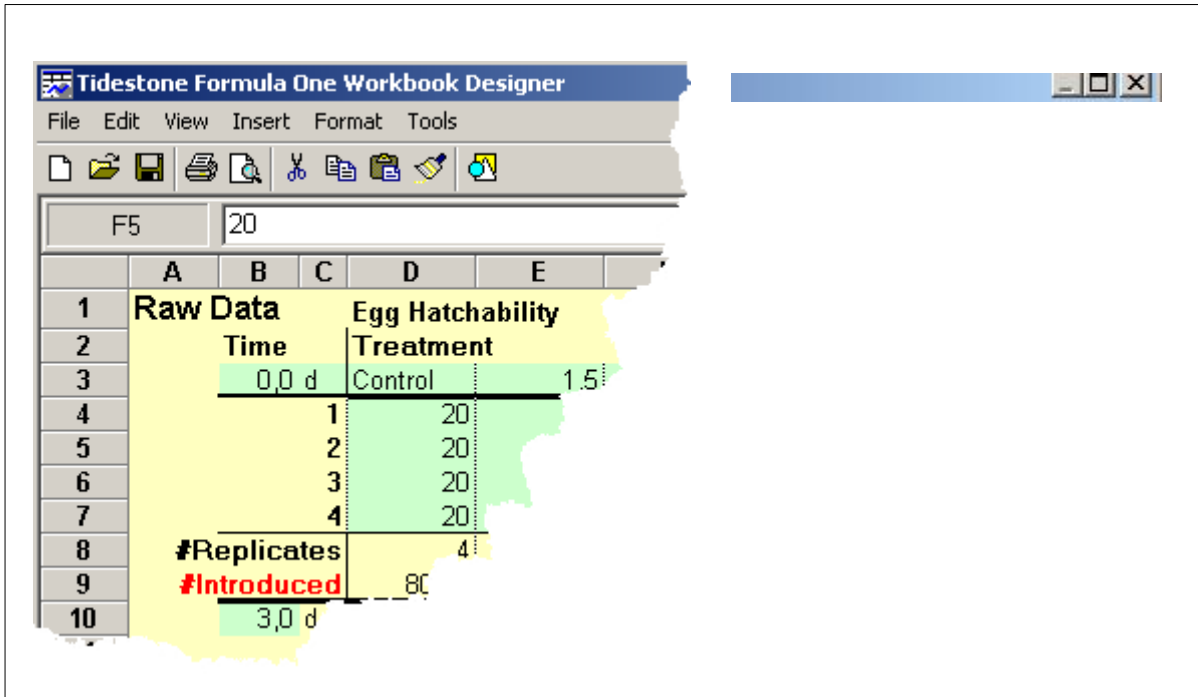


Abbildung 10: Benutzeroberfläche Workbookdesigner

Um ein Datenblatt bearbeiten zu können, müssen Sie zunächst den Blattschutz aufheben – dies geschieht über die Befehle Format-Sheet-Protection (Abbildung 11).

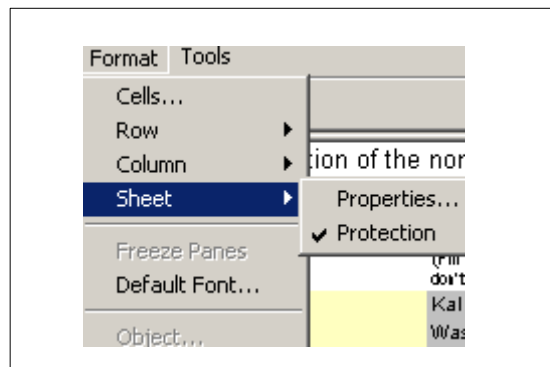


Abbildung 11: Blattschutz aufheben im Workbookdesigner

Die übrigen Menüs und Befehle des Workbookdesigners entsprechen im Wesentlichen denen aus MS Excel und werden hier nicht weiter besprochen. Sie benötigen in erster Linie die Befehle zum Kopieren und Einfügen von Zeilen bzw. Spalten.

Beim Einfügen zusätzlicher Testansätze (Behandlungen) kopieren Sie am besten die Inhalte einer bestehenden Spalte in eine leere Spalte rechts neben dem bestehenden Datenblock, dann haben Sie automatisch auch die entsprechenden Zellformeln für die Berechnung von Summen, Mittelwerten usw. übernommen.

Beim Einfügen von Replikaten (Zeilen) müssen Sie darauf achten, dass dies in allen Messintervallen gleichmäßig geschieht, damit am Schluss die Replikatzahl in allen Messintervallen wieder gleich ist. Achtung: bitte stellen Sie sicher, dass beim Einfügen von Zeilen in die einzelnen Messintervalle die Zellbezüge in den Formeln für die jeweiligen Summen, Mittelwerte, Standardabweichungen usw. mit aktualisiert werden. Komplette Messintervalle können Sie ergänzen, indem Sie einen bestehenden Block kopieren und unter das letzte bestehende Messintervall einfügen.

Durch einen Klick auf das Kreuzchen recht oben in der Menüleiste verlassen Sie den Workbook-Designer und kehren zurück zur Benutzeroberfläche von ToxRat.

Der Workbookdesigner macht es möglich, ToxRat gänzlich unabhängig von MS Excel zu verwenden. Falls Sie jedoch mit MS Excel vertraut sind, ist es möglicherweise komfortabler, nötige Workbook-Anpassungen direkt mit MS Excel zu erledigen. Die obigen Ausführungen zum Aufheben des Blattschutzes und der Aktualisierung der Formelbezüge gilt in diesem Fall natürlich ebenso.

4 Die Auswertung

4.1 Menüs und Buttons im Auswertebildschirm – Auswertung starten

Sobald Sie ein Workbook geöffnet haben, erscheinen neue Menüpunkte und Buttons für die Auswertung in der Menüleiste. Auch diese sind Kontext spezifisch, d.h. welche das sind, hängt davon ab, ob Sie ein Biotest-Workbook geöffnet haben oder ein Generic Data Workbook.

4.1.1 Der Auswertebildschirm bei Biotest-Workbooks

Unsere Beispieldateien sind:

ToxRat Professional: Workbook OECD210

ToxRat Monitor: Workbook DIN EN ISO 15088

Abbildung 12 zeigt die neue Menüleiste, wenn ein Biotest-Workbook geöffnet ist.

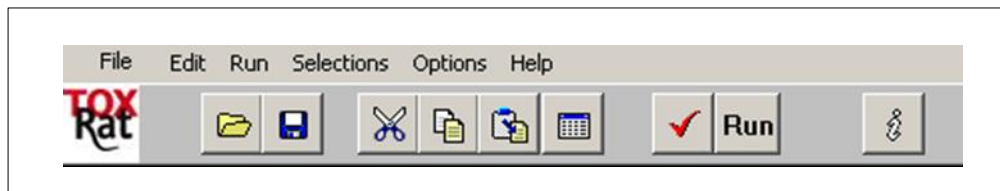


Abbildung 12: Menüleiste im Auswertebildschirm – Biotest-Workbook

Neu hinzugekommene Befehle für die Auswertung sind:



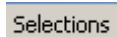
Das „Herz“ von ToxRat!

Startet die Auswertung. Näheres dazu siehe unten.



„refresh“ – liest die gesamte Datei neu ein;

Erforderlich sowohl nach der Eingabe neuer Daten, als auch nach Änderung einiger Einstellungen in verschiedenen Menüs (in diesen Fällen steht dabei „changes require clicking the refresh button“). Bereits vorhandene Auswertungen werden durch „refresh“ gelöscht. Wichtig: Vorher vorgenommene Einstellungen unter Options bleiben erhalten, Einstellungen unter „selections“ jedoch werden auf „Werkszustand“ zurückgesetzt (siehe dazu Kapitel 4.2).



Hier legen Sie fest, welche Variablen, Messzeitpunkte und Testansätze in die nächste, mit RUN gestartete Auswertesequenz eingehen und ob Daten transformiert werden sollen. Näheres dazu finden Sie in Kapitel 4.2.



Unter Options gibt es nun neue Unterpunkte, mit deren Hilfe Sie die Validitätskriterien und bestimmte statistische Methoden abweichend von den programmseitigen Voreinstellungen individuell auswählen und festlegen können. Genaueres dazu erfahren Sie in Kapitel 4.3 und in den Kapiteln zu den jeweiligen statistischen Verfahren 4.7).

Der wichtigste neu hinzugekommene Befehl ist im Auswertebildschirm ist:



Mit dem Befehl RUN starten Sie eine vollständige Auswertesequenz. Dabei werden programmseitige Voreinstellungen verwendet. Diesem Expertenvorschlag können Sie folgen – Sie müssen aber nicht. Sie können sich jedoch anhand einer Standard-Auswertung zunächst einen Überblick über die Datenlage verschaffen – und dann gegebenenfalls gezielt einzelne Methoden ändern.

Je nachdem, um welchen Biotest es sich handelt (d.h. welche Guideline damit verknüpft ist), löst ein Klick auf den RUN-Button bestimmte Auswertungen aus, die als Sammelauftrag „in einem Rutsch“ durchgeführt werden. In jedem Fall gilt: RUN erzeugt die Ergebnisse, die gemäß der entsprechenden Guideline gefordert werden, einschließlich Validitätsprüfung.

Für unser Beispiel OECD 210 (Fish Early Life Stage Toxicity Test) bedeutet das: durch einen Klick auf RUN werden EC_x-Werte und NOECs für mehrere Variablen und Messzeitpunkte zwischen 3 Tagen und 35 Tagen ermittelt sowie eine Validitätsprüfung durchgeführt – wie in der Testguideline vorgeschrieben.

Probieren Sie es an dieser Stelle einmal aus! Eine genaue Beschreibung der erzeugten Ergebnisse („Was finden Sie wo?“) bekommen Sie in Kapitel 6. Fürs Erste können Sie die Ergebnisse wieder löschen, indem Sie den „refresh“-Button drücken.

Welche statistischen Methoden für die Biotestauswertung jeweils automatisch angewendet werden und wie Sie die programmseitige Auswahl ändern können, erfahren Sie in Kapitel 4.3.

Beim Beispiel DIN EN ISO 15088 (Acute Toxicity of Waste Water to Fish Eggs of *Danio rerio*) gibt es nur Daten für eine Variable (Mortalität) an zwei Messzeitpunkten (24 Stunden, 48 Stunden), für diese werden entsprechend der Vorgaben der Guideline jeweils EC-Werte sowie die LID (lowest ineffective dilution) berechnet, sowie eine Validitätsprüfung durchgeführt. Auch hier gilt: probieren Sie es aus!



„Refresh“ liest veränderte Einstellungen oder Daten ein. Außerdem wird der programminterne, temporäre Speicher gereinigt. Dies kann manchmal sehr hilfreich sein, wenn dieser nach diversen Auswertungsvarianten ein und derselben Datei derart voll ist, dass es zu unerwünschten Darstellungen oder zu Programm„hängern“ kommt

4.1.2 Der Auswertebildschirm bei Generic-Data-Workbooks

Unsere Beispieldatei für alle ToxRat Programme ist das Workbook „Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls“.

Abbildung 13 zeigt die neue Zeile, wenn ein Generic-Data-Workbook geöffnet ist.

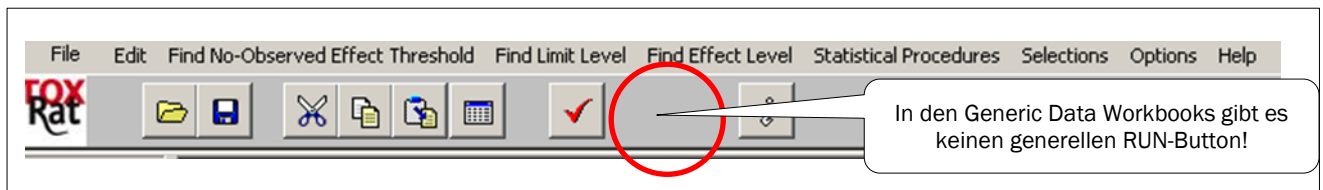


Abbildung 13: Menüzeile Auswertebildschirm – Generic Data Workbook

Die folgenden Buttons und Befehle sind dieselben wie bei den Biotest-Workbooks:



„refresh“ –siehe Erläuterung zu Biotest-Workbooks; gilt hier genauso.

Selections

Siehe Erläuterung zu Biotest-Workbooks; gilt hier genauso.

Außerdem sind neue Menüpunkte hinzugekommen, mit denen gezielt statistische Verfahren ausgewählt werden können („Find no Observed Effect Treshold“, „Find Limit Level“, „Find Effect Level“, „Statistical Procedures“). Näheres dazu erfahren Sie in Kapitel 4.3.2.

Ehe Sie jedoch statistische Methoden auswählen, erfahren Sie, wie Sie festlegen, welche Daten überhaupt ausgewertet werden sollen. Dazu schauen wir uns im nächsten Kapitel den Menüpunkt „Selections“ an.

4.2 Welche Daten auswerten? Das „Selections“-Menü Oder: Auswahl Variablen, Messzeitpunkte, Behandlungen, Transformationen

Unabhängig davon, ob Ihre Daten in einem Biotest Workbook oder als Generic Data Workbook vorliegen und welches statistische Verfahren Sie anwenden möchten, können Sie festlegen, welche der im Workbook vorhandenen Daten überhaupt statistisch ausgewertet werden sollen. Das heißt, welche Variablen und welche Messzeitpunkte Sie benötigen, ob bestimmte Behandlungen vorübergehend von der Auswertung ausgeschlossen und ob die Daten transformiert werden sollen. Dazu verwenden Sie den Menüpunkt „Selections“. Wichtig: Alle Einstellungen dort sind optional - wenn Sie dort gar keine Einstellungen vornehmen, verwendet ToxRat eigene Voreinstellungen.



Für die Auswertung der Workbooks ist im selections- bereits alles Nötige voreingestellt („initial state“). Für Standardauswertungen benötigen Sie das Menü „selections“ also nicht!

Und ebenso wichtig zu wissen:

Die von Ihnen gewählten Einstellungen unter selections bleiben nur für die unmittelbar folgende Auswertung erhalten. Sobald einmal “refresh” oder „restore default settings“ geklickt, eine neue Auswertung mit RUN gestartet, oder das Workbook neu geöffnet wird, werden alle Einstellungen unter selections zurückgesetzt auf die Standardwerte.

Das ist bewusst so vorgesehen, um zu verhindern, dass bei einer Auswertung versehentlich bestimmte Daten von der Auswertung ausgeschlossen bleiben.



Einstellungen unter “selections” sind grundsätzlich nur temporär. Das heißt, sie gelten ausschließlich für die unmittelbar folgende Auswertung. Deshalb empfiehlt es sich, eventuelle Einstellungen im selections-Menü stets als Letztes vor dem Start der Auswertung vorzunehmen.

Abbildung 14 gibt einen Überblick über die Einstellmöglichkeiten im selections-Menü.

Verwenden Sie die folgenden Beispieldateien:

ToxRat Professional: Workbook OECD210

ToxRat Monitor: Workbook DIN EN ISO 15088

ToxRat Standard: Workbook „Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls“.

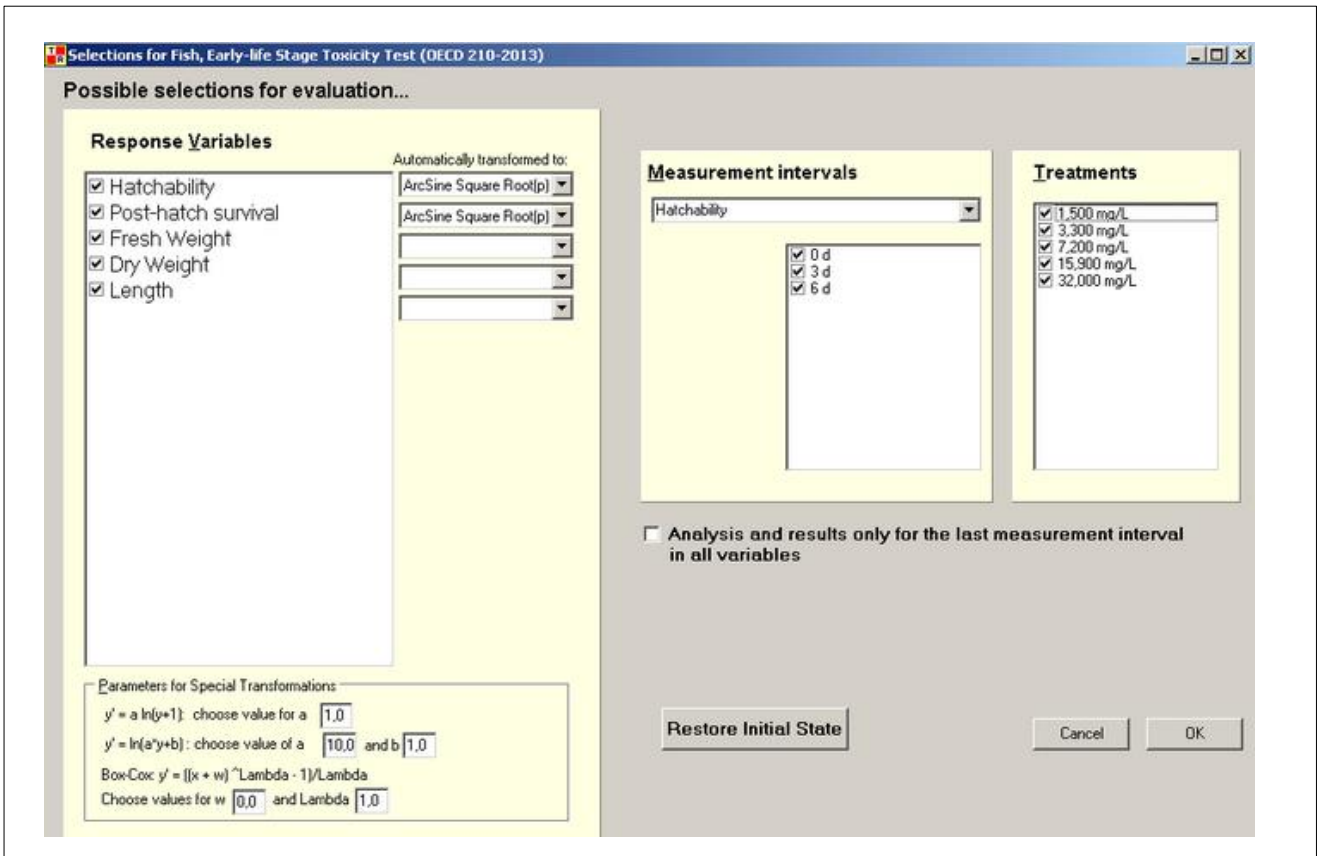


Abbildung 14: Menü „Selections“ – Auswahlmöglichkeiten für Biotest-Workbook OECD 210

Response variables

Hier sind alle Variablen gelistet, die mit dem aktuellen Workbook ausgewertet werden können. Vorausgewählt sind diejenigen Variablen, die in der nächsten Auswertung enthalten sein werden. In den Generic-Data-Workbooks ist das grundsätzlich nur eine, in den Biotest-Workbooks kann die Liste jedoch recht lang sein. Wenn Sie nicht alle davon benötigen, können Sie hier bestimmte Variablen temporär abwählen.

Daten-Transformation

Manchmal ist es sinnvoll, die Originaldaten zu transformieren, sei es, um quantale Daten mit parametrischen Tests auswerten zu können, oder sei es, um für metrische Daten Normalverteilung und Varianzhomogenität zu erreichen.

Für metrische Variablen können Sie individuell für jede metrische Variable eine Funktion auswählen und ggfls. individuell anpassen (siehe Abbildung 15). Diese wird dann in der nächsten Auswertung angewendet.

Für quantale Variablen wird im Hintergrund grundsätzlich ein arc-sinus-transformierter Parallel-Datensatz vorgehalten. Dieser kommt aber nur dann zum Einsatz, wenn Sie einen parametrischen Test zur NOEC-Bestimmung wählen – dies geschieht nicht in diesem Menü, sondern unter Options (siehe Kapitel 4.4.1).

Da das Programm zu diesem Zeitpunkt noch „nicht wissen kann“, welchen Test Sie als Benutzer wählen werden (einen parametrischen oder einen nicht-parametrischen), wird im selections- für quantale Variablen stets die arc-sinus-Transformation angezeigt. Sie müssen - und können - hier also nichts einstellen!

ToxRat rechnet standardmäßig (default settings) sowohl für metrische als auch für quantale Variablen stets mit den untransformierten Originaldaten. Wenn Sie eine Datentransformation veranlassen, wird die angewendete Funktion in den Ergebnistabellen der jeweiligen Variable genannt, so dass stets ersichtlich ist, ob die Auswertung auf den Originaldaten oder auf transformierten Daten basiert.

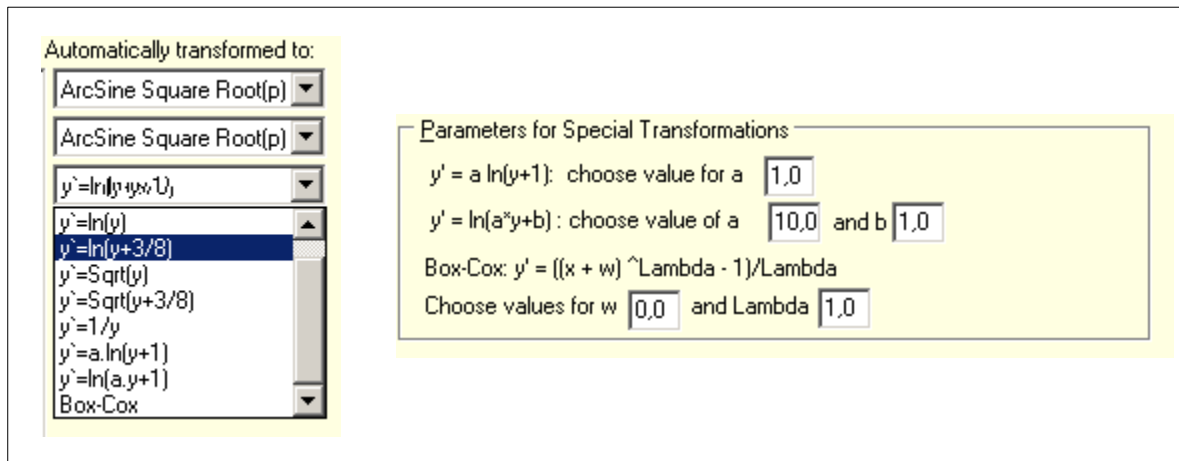


Abbildung 15: Im Selections- einstellbare Daten-Transformationen für metrische Daten

Measurement Intervals

Sofern mehrere Messzeitpunkte existieren, können Sie hier einzelne davon von der nächsten Auswertung ausschließen oder zusätzlich einbeziehen. Das können Sie für jede Variable individuell einstellen, indem Sie die jeweilige Variable im ganz oben stehenden Pull-down-Menü auswählen.

Um Ihnen die Arbeit zu erleichtern, ist die häufig verwendete Einstellung „Nur letztes Messintervall für alle Variablen“ per Auswahlbox mit nur einem Häkchen wählbar.

Behandlungen (Treatments)

Über die Auswahlbox „treatments“ können Sie ausprobieren, wie sich das Weglassen einzelner Behandlungen auf die Ergebnisse der Berechnungen auswirken würde. Die kann dann eine sinnvolle Option sein, wenn z.B. der Verdacht besteht, dass das Ergebnis einer bestimmten Behandlung aus versuchstechnischen Gründen fehlerhaft ist. Sie können dann probeweise eine Auswertung ohne diese Behandlung durchführen, ohne die entsprechenden Rohdaten löschen zu müssen. Natürlich sind standardmäßig alle vorhandenen Behandlungen zur Auswertung vorgesehen.

4.3 Auswahl der statistischen Methode

Egal, ob Sie Anwender von ToxRat Professional, ToxRat Monitor oder ToxRat Standard sind: Alle ToxRat Programme beinhalten dieselben statistischen Methoden! Die Art der Bedienung hängt jedoch vom Workbook-Typ ab.

ToxRat beinhaltet ein bestimmtes Expertenwissen, unter welchen Voraussetzungen und mit welchen Randbedingungen eine bestimmte statistische Methode angewendet werden sollte. Sie können diesen Empfehlungen folgen (d.h. die default settings verwenden) – oder diese durch Ihre individuellen Einstellungen ersetzen. In diesem Kapitel erfahren Sie, wo Sie die entsprechenden Menüs finden, wie Sie Ihre Einstellungen kontrollieren und speichern und wie Sie gegebenenfalls zu den programmseitigen Voreinstellungen zurückkehren können.

4.3.1 Auswahl der statistischen Methode bei Biotest-Workbooks

Sie haben bereits gesehen, dass Sie eine Auswertung durchführen können, ohne selbst auch nur eine einzige statistische Methode auszuwählen oder festzulegen – indem Sie einfach auf RUN klicken und ToxRat die Auswahl der Methoden überlassen. ToxRat verwendet dabei Voreinstellungen, die in jedem Fall eine korrekte Auswertung Ihrer Daten garantieren. Möglicherweise bevorzugen Sie – oder Ihr Auftraggeber – jedoch andere Methoden oder aber die Datenlage macht es erforderlich, alternative Methoden auszuprobieren. In diesem Fall haben Sie die Möglichkeit, die programmseitigen Voreinstellungen („default settings“) durch Ihre individuellen Einstellungen („user settings“) zu ersetzen.

Verwenden Sie die folgenden Beispieldateien:

ToxRat Professional: Workbook OECD210 , ToxRat Monitor: Workbook DIN EN ISO 15088

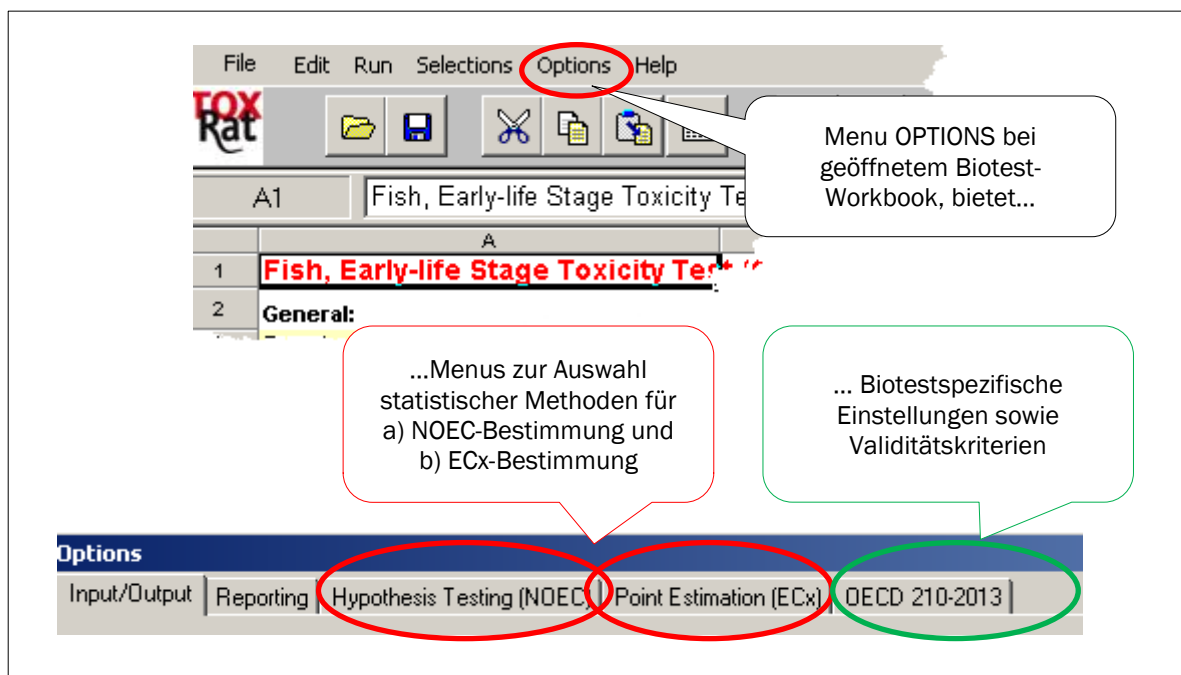


Abbildung 16: Neuer Inhalt des Options-Menüs bei geöffnetem Biotest-Workbook.

Um statistische Methoden auszuwählen, gehen Sie über das Options-Menü. Dieser Menüpunkt ist Ihnen schon vom Startbildschirm bekannt, da er jedoch Kontext-sensitiv ist, bietet er nun, bei geöffnetem Biotest-Workbook, zusätzliche Auswahlmöglichkeiten (Abbildung 16).

Im Optionsmenü finden Sie zum einen eine Registerkarte mit testspezifischen Einstellungen und Validitätskriterien (Reiter mit Biotestbezeichnung, hier: OECD 210). Zum anderen finden Sie hier Methoden zur Schwellenwertberechnung („Hypothesis Testing NOEC“) und zur Ableitung von Dosis-Wirkungsbeziehungen (Point Estimation EC_x). Welche statistischen Methoden dabei jeweils verfügbar sind, wie Sie diese auswählen und welche Voreinstellungen zu treffen sind, wird in Kapitel 4.4 bis 4.7 erklärt.

4.3.2 Auswahl der statistischen Methode bei Generic Data-Workbooks

Verwenden Sie die folgenden Beispieldatei: „Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls“.

Die „schlechte“ Nachricht ist: es gibt keinen generellen Befehl RUN!

Das liegt daran, dass die Generic Data-Workbooks nicht mit einer bestimmten Guideline verknüpft sind und somit programmseitig nicht festgelegt ist, welche statistischen Endpunkte ausgewertet werden.

Die „gute“ Nachricht ist: Statt dessen gibt es neue Menüpunkte wie „Find-No-Observed-Effect-Treshold“, „Find Limit Level“ und „Find Effect Level“ (Abbildung 17).

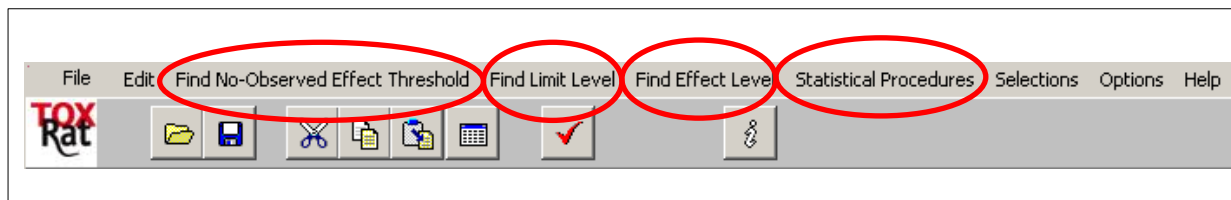


Abbildung 17: Befehle zur statistischen Auswertung bei Generic Data Workbooks

Damit können Sie ToxRat „beauftragen“, eine entsprechende Auswertung mit programmseitigen Voreinstellungen durchzuführen. Sie müssen dabei nicht selbst entscheiden, welche Verfahren und Einstellungen angewendet werden sollen, sondern können das integrierte Expertenwissen in Sachen Statistik nutzen. Mit „Find No observed Effect Treshold“- und „Find Limit“ erhaltenen Sie nach einer automatisch durchlaufenen Sequenz aus Vortests und Haupttest eine NOEC bzw. eine Limit-Konzentration. Natürlich können Sie die Voreinstellungen jederzeit durch Ihre eigene Auswahl ersetzen (Kapitel 4.4 und 4.5).



Ab ToxRat 3.0 können Sie auch in den Generic Workbooks eine programmgesteuerte Auswertesequenz aus Vortests und passendem Haupttest für die NOEC- und Limit-Bestimmung mit einem Knopfdruck veranlassen – dazu gibt es im entsprechenden Dialogfenster einen RUN-Button.

Mit „Find Effect Level“ können Sie ECx-Werte berechnen lassen. Auch hierfür stehen Voreinstellungen zur Verfügung, Sie müssen jedoch selbst prüfen, inwieweit die Ergebnisse sinnvoll sind. Ggfls. müssen Sie alternative Methoden und Einstellungen zur ECx-Bestimmung wählen. Kapitel 4.6 bietet dazu Orientierungshilfen.

Zunächst jedoch möchten wir Ihnen noch den Punkt „Statistical Procedures“ vorstellen, der ebenfalls im Auswertebildschirm für Generic Workbooks (Abbildung 17) verfügbar ist. Im Gegensatz zu den „Find xyz“-Menüs, die jeweils komplette *Testsequenzen* auslösen, bietet „Statistical Procedures“ bestimmte Verfahren *separat* an, d.h. Sie können einzelne statistische Methoden wählen und starten (Abbildung 18). Wählen Sie die verschiedenen Menüpunkte einfach einmal an, um zu erfahren, welche statistischen Methoden vorhanden sind.

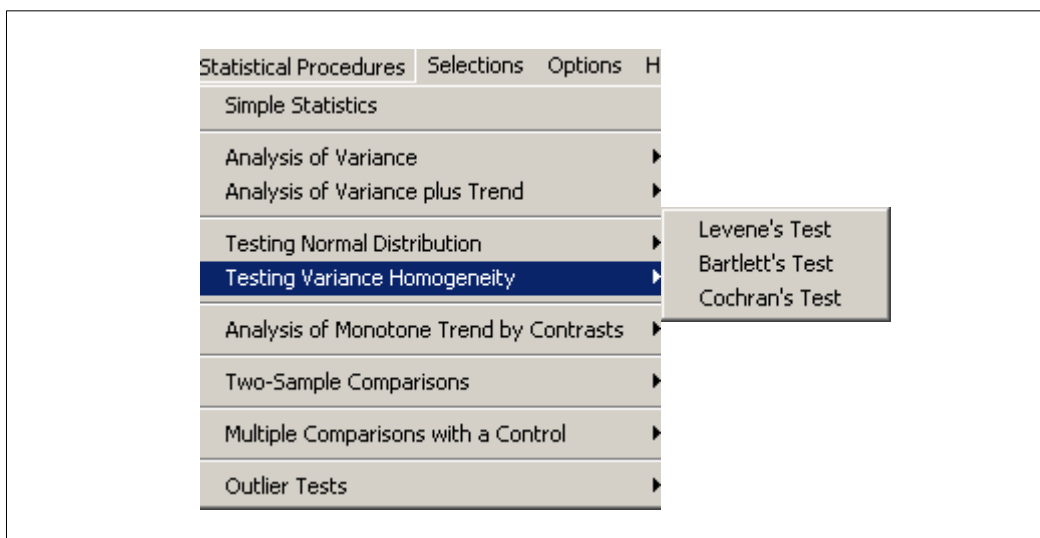


Abbildung 18: Das Menü „Statistical Procedures“

Auch die Inhalte des Pull-down-Menüs „Statistical Procedures“ sind wieder Kontextspezifisch, d.h. je nachdem, ob Sie ein Workbook für quantale oder für metrische Daten geöffnet haben, zeigt ToxRat Ihnen die Methoden an, die für den jeweiligen Variablentyp in Frage kommen. Die einzelnen Verfahren werden in Kapitel 4.7 vorgestellt und besprochen. Wir möchten Ihnen jedoch an dieser Stelle bereits einige Hinweise zur grundsätzlichen Bedienung geben.

In der Regel öffnet sich nach Auswahl eines Verfahrens ein Dialogfenster, in dem Sie wichtige Randbedingungen durch einen Klick auf den Radio-Button festlegen können (Abbildung 19).

Voreingestellt sind das Signifikanzniveau („Significance Level“, „Alpha“, „Irrtumswahrscheinlichkeit“), die Seitigkeit („Test Direction“) und – bei manchen parametrischen Tests – die Art der verwendeten Varianz („Which Variance to Use“). Sie müssen hier nichts einstellen – wenn Sie nichts verändern, werden die programmseitigen Empfehlungen verwendet. Bei Vortests auf Normalverteilung und Varianzhomogenität liegt der empfohlene Wert für das Signifikanzniveau bei 1% (0.01). Alle anderen Tests werden standardmäßig mit einem Signifikanzniveau von 5% (0.05) durchgeführt.

Bestimmte Tests werden bedingt durch die Fragestellung grundsätzlich zweiseitig durchgeführt. In diesen Fällen ist das entsprechende Auswahlkästchen deaktiviert, d.h. diese Einstellung können Sie dann nicht verändern. Ansonsten gilt: bei metrischen

Variablen ist die voreingestellte Testrichtung „einseitig kleiner“, bei quantalen Variablen wie Mortalität in der Regel „einseitig größer“. Dies können Sie jedoch bei Bedarf ändern. Beim paarweisen und multiplen t-Test können Sie entscheiden, ob die Residual Varianz aus einer vorgeschalteten ANOVA verwendet werden soll oder die individuellen Varianzen der Kontrolle und Behandlungen. Voreingestellt ist jeweils die teststärkere Variante. Bei den meisten parametrischen Tests ist die Art der verwendeten Varianz durch den Test selbst festgelegt, dann ist der Auswahlkasten inaktiviert.

Alle in diesem Dialogfenster festgelegten Randbedingungen eines Tests werden in der jeweiligen Legende der Ergebnistabelle genannt. Ein Klick auf „ok“ startet die Auswertung.

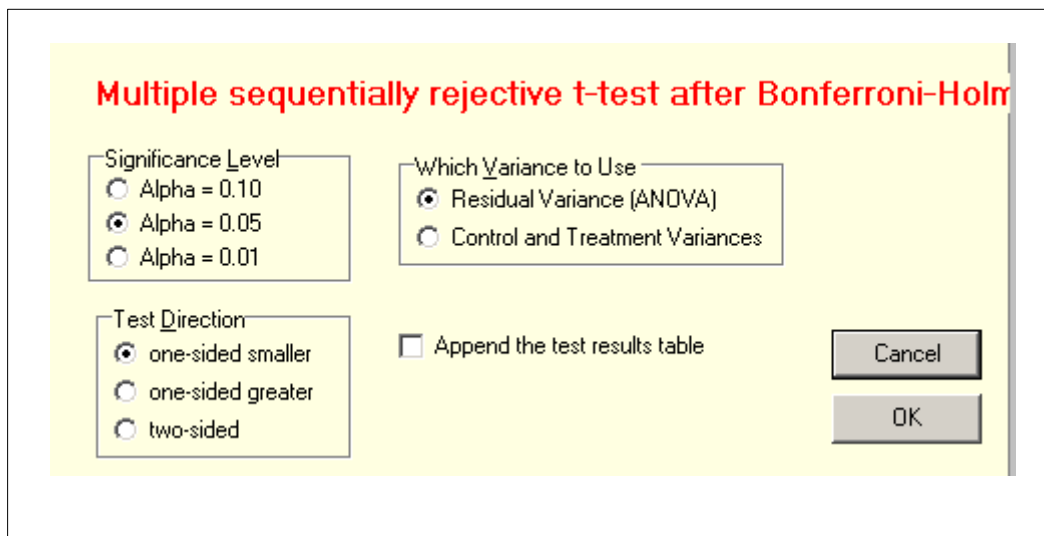


Abbildung 19: Dialogfenster nach Auswahl eines statistischen Verfahrens

Um Ihnen die Arbeit zu erleichtern, gibt es das Kontrollkästchen „Append the test results table“. Ist es nicht angeklickt, werden Ergebnisse früherer Auswertungen mit dem aktuellen Datensatz vor der nächsten Auswertung gelöscht und Sie bekommen nur die Ergebnisse der aktuell gewählten Auswertung angezeigt. Ist „Append the test results table“ angeklickt, werden die nächsten Ergebnistabellen zu bereits bestehenden Ergebnissen hinzugefügt.



Wenn das Kontrollkästchen „Append the test results table“ angeklickt ist, werden die nächsten Ergebnisse an diejenigen, die Sie vorher mit demselben Datensatz erzeugt hatten, angehängt. Dadurch können Sie Ergebnisse verschiedener statistischer Tests in einer Datei sammeln, speichern und abschließend in einem Gesamtreport darstellen. Andernfalls werden vorherige Ergebnisse gelöscht und nur die Ergebnisse des aktuell gewählten Verfahrens gezeigt.

4.3.3 Einstellungen prüfen, speichern und Standard-Einstellungen wieder herstellen

Wie den Überblick behalten über die vielen Einstellungen?

Die Einstellungen, mit denen ein bestimmter Biotest ausgewertet wurde (gewählte Vortests und Haupttests, Signifikanzniveau, Seitigkeit, Validitätskriterien usw) werden in einer sogenannten settings-Tabelle zusammengefasst und – optional - zusammen mit den Ergebnissen aufgelistet. Dadurch können Sie auch im Nachhinein jederzeit prüfen, ob und ggfl. welche Standardeinstellungen geändert wurden. Mehr dazu erfahren Sie bei der Besprechung der Ergebnisdarstellung in Kapitel 6.5.2.

Woher „weiß“ ToxRat, welche Einstellungen es für bestimmte Auswertungen verwenden soll?

Die Einstellungen, die ToxRat anwenden soll, sind in sogenannten settings-Dateien gespeichert. Es gibt für jeden Workbook-Typ eine Settings-Datei (z.B. set_OECD210.stp). Wann immer Sie ein Workbook eines bestimmten Typs öffnen, liest ToxRat die Einstellungen aus der zugehörigen settings-Datei ein. Im „Werkzustand“ sind das die programmseitigen Voreinstellungen.

Möglicherweise führen Sie jedoch routinemäßig einen bestimmten Biotest immer mit bestimmten Einstellungen zur Statistik durch, die von den ToxRat-Standardeinstellungen abweichen. Dann wäre es äußerst lästig, wenn Sie diese jedes mal auf´s Neue ändern müssten – insbesondere wenn es sich um ein Workbook mit vielen verschiedenen Messvariablen handelt.

Deshalb werden Ihre individuellen Benutzereinstellungen gespeichert. Immer dann, wenn Sie ein Workbook mit Ergebnis-Seiten abspeichern, werden auch die aktuellen - Einstellungen, mit denen diese Ergebnisse generiert wurden, in der zugehörigen settings-Datei gespeichert. Gegebenenfalls werden dabei die Standardeinstellungen überschrieben. Die abgespeicherten Einstellungen sind damit – unabhängig von den aktuellen Daten – automatisch wieder verfügbar, sobald Sie ein Workbook des gleichen Typs aufrufen. Also z.B. wieder ein Workbook für den Biotest nach OECD 210 – auch wenn es sich um einen anderen Datensatz (also eine andere Datei) handelt.

Standardeinstellungen überschrieben – was nun?

Was auch immer Sie bei den Einstellungen („settings“) verändern: Sie können die empfohlenen Standardeinstellungen jederzeit durch einen Klick auf „restore default settings“ wiederherstellen. Den Button „restore default settings“ finden Sie auf der Hauptseite des Options-Menüs, unten (Abbildung 20). Er ist dort angesiedelt, weil er übergeordnete Gültigkeit hat - dabei gibt es zwei Einstellungs Ebenen:

Ist ein Workbook geöffnet, setzt ein Klick auf „restore default settings“ die Einstellungen zur ECx und NOEC-Auswertung für alle Variablen und alle statistischen Methoden in sämtlichen Menüs für das aktuelle Workbook zurück auf Standard-Einstellungen – jedoch nicht die Einstellungen unter „Input-Output“ und „Reporting“ (siehe Abbildung 90 und Abbildung 94). Diese bleiben permanent für das aktuelle und jedes neu geöffnete Workbook.

Ist kein Workbook geöffnet, setzt ein Klick auf „restore default settings“ die Einstellungen unter „Input-Output“ und „Reporting“ zurück.

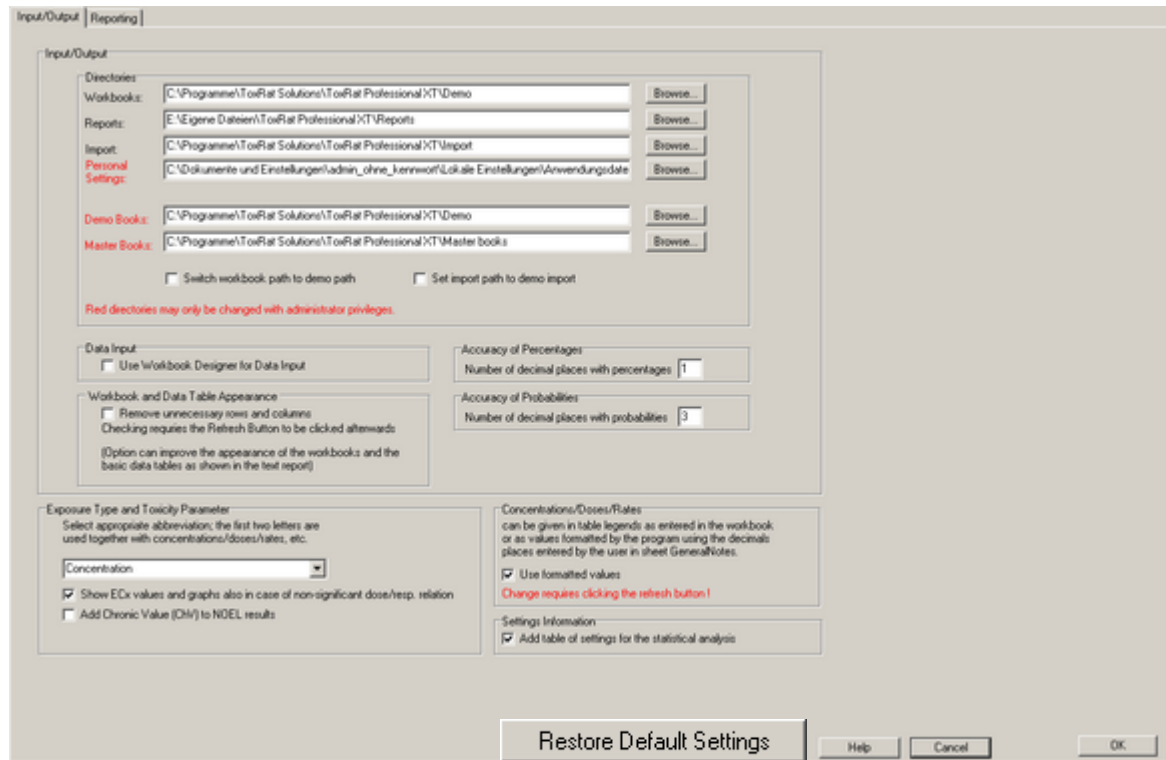


Abbildung 20: Button „Restore Default Settings“ im Options-Menü



„Restore Default Settings“ bei geöffnetem Workbook setzt alle Einstellungen zu ECx und NOEC für den aktuellen Workbooktyp mit einem einzigen Klick zurück auf die programmseitigen Standardeinstellungen.

„Restore default settings“ ohne geöffnetes Workbook setzt alle Einstellungen in Input-output und „Reporting“ zurück auf Standardeinstellungen.

ToxRat listet die Einstellungen, mit denen Sie einen Datensatz ausgewertet haben, zusammen mit den Ergebnissen in einer Tabelle auf. So können Sie auch im nachhinein rekonstruieren, mit welchen Einstellungen eine Auswertung durchgeführt wurde. Außerdem werden die Einstellungen in workbook-spezifischen settings-Dateien abgespeichert und automatisch wieder verwendet, sobald Sie das nächste mal ein Workbook desselben Typs öffnen – solange Sie nicht „restore default settings drücken.



Wir empfehlen, eine Datei zunächst mit Standardeinstellungen auszuwerten, die Ergebnisse zu analysieren und dann ggfls. gezielt einzelne Einstellungen zu verändern. Fazit: Lieber einmal zu oft als einmal zu wenig „restore default settings“!



Die settings-Dateien werden in einem bestimmten, benutzerspezifischen Verzeichnis abgespeichert (Siehe Kapitel 9, Installation). So kann jeder Benutzer seine individuellen Einstellungen verwenden, auch wenn mehrere Benutzer mit ToxRat arbeiten. Wird ein Workbook geöffnet, für das in diesem Verzeichnis (noch) keine entsprechende settings-Datei vorhanden ist, so legt ToxRat diese mit programmseitigen Standardeinstellungen an.

4.4 Verfahren zur NOEC-Bestimmung (multiples Testen)

Bei der Auswahl eines statistischen Tests zur Ableitung einer No-Observed-Effect-Concentration (NOEC) gibt es bestimmte Kriterien:

- Variablentyp (metrisch oder quantal)?
- Sind die Daten repliziert??
- Sind die Daten Normalverteilt?
- Sind die Daten Varianzhomogen?
- Besteht eine monotone Dosis-Wirkungsbeziehung?

Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen je ein generelles Schema zur Testauswahl. An diesen Schemata können Sie sich orientieren, wenn Sie eine NOEC Bestimmung durchführen möchten.

Im automatischen Auswertemodus arbeitet ToxRat diese Testschemata mit den aktuellen Daten schrittweise ab, entscheidet je nach Ausgang eines Vortests über die geeigneten weiteren Tests und filtert auf diese Weise schließlich einen passenden multiplen Tests zur NOEC-Bestimmung heraus, der dann durchgeführt wird.

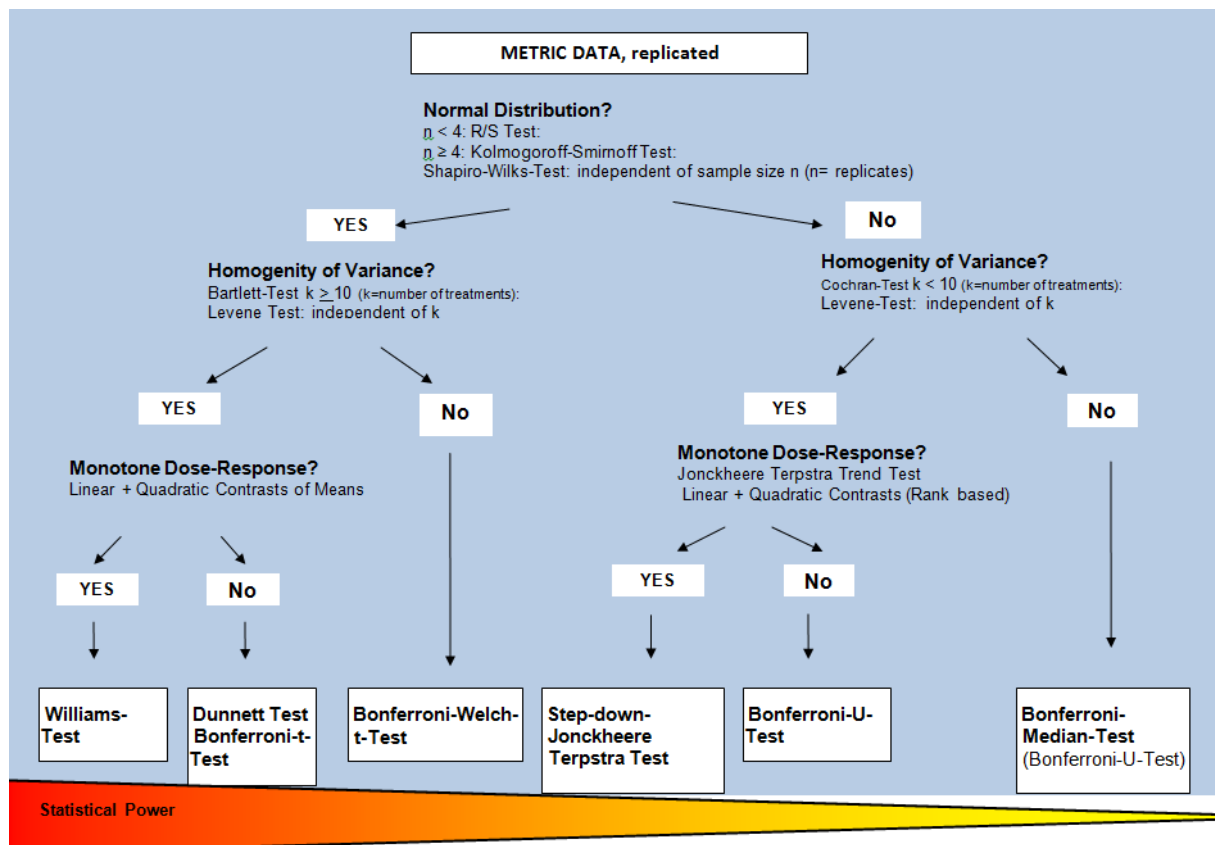


Abbildung 21: In ToxRat angewendetes Testschema zur NOEC-Bestimmung bei metrischen Daten

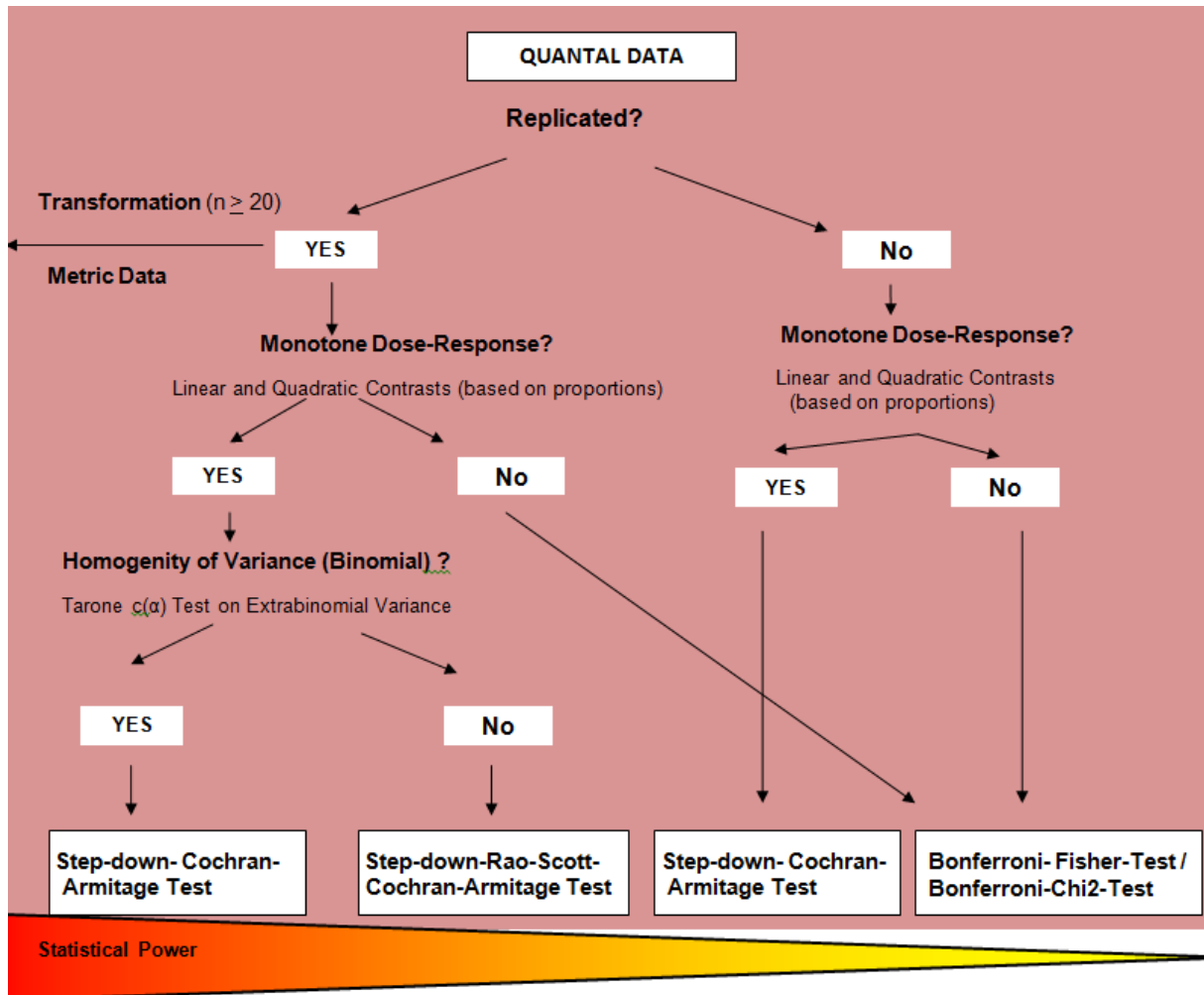


Abbildung 22: In ToxRat angewendetes Testschema zur NOEC-Bestimmung bei quantalen Daten



Hinweis für Anwender der früheren Version 2.10.05:
Ab ToxRat 3.0 steht Ihnen auch für die Generic Workbooks der automatische Auswertemodus für die NOEC-Bestimmung zur Verfügung (d.h. programmgesteuerte Auswertesequenz aus Vortests und passendem Haupttest) – dazu gibt es im entsprechenden Dialogfenster einen RUN-Button.

In Abbildung 21 und Abbildung 22 sind die verfügbaren multiplen Tests zur NOEC-Bestimmung nach Teststärke angeordnet: die Teststärke nimmt von links nach rechts ab. Grundsätzlich gilt: nur wenn ein bestimmtes Kriterium erfüllt ist (z.B. Normalverteilung), dürfen weitere Verfahren aus dieser Schiene gewählt werden. Sie müssen jedoch nicht gewählt werden. Das heißt, es ist aus statistischer Sicht nicht verboten, z.B. für einen normalverteilten Datensatz Testverfahren zu wählen, die keine Normalverteilung voraussetzen. Man verschenkt in diesem Fall allerdings Teststärke.

Im automatischen Auswertemodus wählt ToxRat unter den statistisch erlaubten Methoden für den gegebenen Datentyp und mit den untransformierten Originaldaten stets das jeweils teststärkste Verfahren aus.

Sie können die programmseitigen Voreinstellungen aber natürlich verändern und bestimmte Vortests oder auch Haupttests benutzerdefiniert festlegen sowie optional zusätzliche Tests hinzuwählen. Die entsprechenden Dialogfenster werden in den folgenden Abschnitten erklärt.

Bei den Generic Workbooks sind alle genannten Tests auch einzeln manuell auswählbar – dies wird in Abschnitt 4.7 „Manuelle Auswahl einzelner statistischer Verfahren“ erläutert. Zunächst beschäftigen wir uns mit der in ToxRat integrierten automatischen Vorgehensweise und wie Sie diese nutzen und steuern können.

4.4.1. NOEC-Bestimmung für metrische Daten

Verwenden Sie die folgenden Beispieldateien:

ToxRat Professional: Workbook OECD210

ToxRat Monitor: Workbook DIN EN ISO 10706

ToxRat Standard: Workbook „Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls“.

Haben Sie ein Biotest-Workbook geöffnet, verwenden Sie bitte den Menüpunkt „Options – Hypothesis-Testing (NOEC)“, haben Sie ein Generic Workbook geöffnet, wählen Sie den Menüpunkt „Find NOEC“ (vergleiche Kapitel 4.3). Es öffnet sich ein Fenster (Abbildung 23), in dem alle Verfahren auswählbar sind, die im Testschema zur NOEC-Bestimmung für metrische Variablen (Abbildung 21) eine Rolle spielen. Das Fenster ist für Biotest-Workbooks und Generic Data Workbooks identisch, mit drei Ausnahmen:

1. Der grüne Variablen-Auswahlkastens (“Select variable for which adjustment applies“), ist den Biotest-Workbooks vorbehalten, da nur dort mehrere Variablen gleichzeitig ausgewertet werden können.
2. Der Kasten „Limit Testing / Two Sample Testing“ ist nur bei den Biotest-Workbooks in diesem enthalten; bei den Generic Data Workbooks ist er (mit identischem Inhalt) unter dem eigenen Menüpunkt „Find Limit Level“ zu finden. Wir besprechen diese Methoden in Kapitel 4.5, „Verfahren zur Bestimmung einer Limit-Konzentration“.
3. Bei den Biotest-Workbooks bestätigen Sie Ihre Auswahlen in diesem Dialogfenster mit „okay“ (unten rechts), die vollständige Auswertesequenz starten Sie anschließend mit dem RUN-Button im Auswertefenster (vgl. Abbildung 12). Bei den Generic Data Workbooks bestätigen *und* starten Sie die gewählten Einstellungen mit dem RUN-Button (unten rechts).



Gibt es mehrere Variablen in einem Workbook, so gelten für jede Variable eigene Standard-Einstellungen. Wenn Sie diese Einstellungen ändern möchten, so müssen (und können) Sie dies für jede Variable getrennt tun.

Für Anwender von ToxRat Professional und ToxRat Monitor: Stellen Sie in dem grünen Variablen-Auswahlkasten zunächst eine metrische Variable ein. OECD 210: „Fresh Weight“; ISO 10706: „Cumulative Offspring per Survivor“.

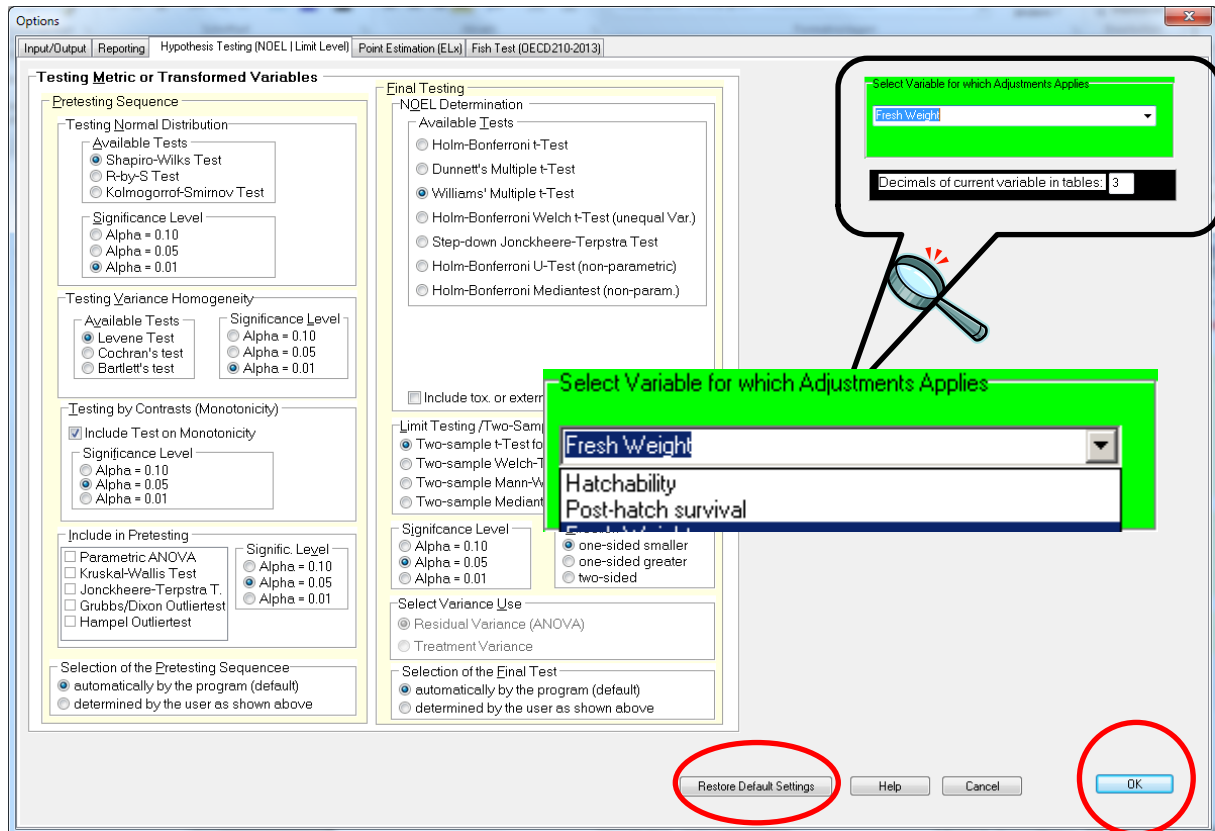


Abbildung 23: Dialogfenster NOEC Bestimmung für metrische Daten

Im Folgenden schauen wir uns die Dialogbox „Testing Metric or Transformed Variables“ genauer an (Abbildung 24). Im linken Teil geht es um Vortests („Pretesting Sequence“), im rechten Teil um die Haupttests („Final Testing“).

Beide Seiten schließen unten mit je einem Kasten ab, in dem Sie festlegen können, ob Sie die Auswahl der Testsequenz ToxRat überlassen wollen („automatically by the program“) oder ob Ihre eigenen Einstellungen verwendet werden sollen („determined by the user as shown above“). Nur wenn Letzteres angeklickt ist, werden ihre persönlichen Einstellungen berücksichtigt!



Ihre eigenen Einstellungen werden nur dann angewendet, wenn Sie den Button „determined by user as shown above“ anklicken. Andernfalls verwendet ToxRat stets seine internen Standard-Einstellungen, unabhängig davon, was im NOEC-Auswahlfenster angeklickt ist.

Achtung: dies bezieht sich ausschließlich auf die obligatorischen Testverfahren, für die ToxRat eigene Voreinstellungen vorschlägt. Zusätzliche Verfahren und Einstellungen („Include in pretesting“, „Include toxic or external standard...“) können auch im Automatikmodus hinzugewählt werden.

Für die obligatorischen Verfahren zur NOEC-Bestimmung sind programmseitige Standardeinstellungen verfügbar – diese sind jederzeit durch drücken des Buttons „restore default settings“ (Abbildung 23, unten links) wieder herstellbar.

Testing Metric or Transformed Variables

Pretesting Sequence

Testing Normal Distribution

Available Tests

- Shapiro-Wilks Test
- R-by-S Test
- Kolmogoroff-Smirnov Test

Significance Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Testing Variance Homogeneity

Available Tests	Significance Level
<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="radio"/> Levene Test <input type="radio"/> Cochran's test <input type="radio"/> Bartlett's test 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Alpha = 0.10 <input type="radio"/> Alpha = 0.05 <input checked="" type="radio"/> Alpha = 0.01

Testing by Contrasts (Monotonicity)

Include Test on Monotonicity

Significance Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Include in Pretesting

<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Parametric ANOVA <input type="checkbox"/> Kruskal-Wallis Test <input type="checkbox"/> Jonckheere-Terpstra T. <input type="checkbox"/> Grubbs/Dixon Outliertest <input type="checkbox"/> Hampel Outliertest 	Signific. Level
	<ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Alpha = 0.10 <input checked="" type="radio"/> Alpha = 0.05 <input type="radio"/> Alpha = 0.01

Selection of the Pretesting Sequence

- automatically by the program (default)
- determined by the user as shown above

Final Testing

NOEL Determination

Available Tests

- Holm-Bonferroni t-Test
- Dunnett's Multiple t-Test
- Williams' Multiple t-Test
- Holm-Bonferroni Welch t-Test (unequal Var.)
- Step-down Jonckheere-Terpstra Test
- Holm-Bonferroni U-Test (non-parametric)
- Holm-Bonferroni Mediantest (non-param.)

Include tox. or external standard

Limit Testing /Two-Sample Testing

- Two-sample t-Test for Homogeneous Variances
- Two-sample Welch-Test for Non-homog. Var.
- Two-sample Mann-Whitney-U-Test (non-param.)
- Two-sample Mediantest

Significance Level	Direction
<ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Alpha = 0.10 <input checked="" type="radio"/> Alpha = 0.05 <input type="radio"/> Alpha = 0.01 	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="radio"/> one-sided smaller <input type="radio"/> one-sided greater <input type="radio"/> two-sided

Select Variance Use

- Residual Variance (ANOVA)
- Treatment Variance

Selection of the Final Test

- automatically by the program (default)
- determined by the user as shown above

Sie möchten Ihre eigenen, benutzerspezifischen Auswahlen anwenden? Dann unbedingt hier klicken!

Und hier!

Abbildung 24: Dialogbox „Testing Metric or Transformed Variables“ zur NOEC Bestimmung, Standardeinstellungen

Entsprechend der Auswahlkriterien für einen geeigneten Test zur NOEC-Bestimmung (bitte orientieren Sie sich an Abbildung 21), gibt es verschiedene Gruppen von **Vortests**: Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks Test, R/S-Test, Kolmogoroff-Smirnov Test), Tests auf Varianzhomogenität (Levene Test, Cochran´s Test, Bartlett´s Test) und Test auf Monotonie (linear und quadratic Contrasts), jeweils mit individuell wählbarem Signifikanzniveau. Diese Vortests werden grundsätzlich zweiseitig durchgeführt, daher gibt es keine Einstellmöglichkeit für die Seitigkeit.



Der Shapiro-Wilks Test und der Levene Test sind die von **ToxRat** voreingestellten Tests auf Normalverteilung bzw. Varianzhomogenität, weil sie den gesamten Datensatz als Ganzes prüfen und so stets eine eindeutige Aussage liefern und weil sie unabhängig sind von Stichprobengröße und -anzahl.

Da Normalverteilung und Varianzhomogenität elementare Voraussetzungen für die Verwendung teststarker Haupttests sind, wird für diese Vortests eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% empfohlen, um das Risiko falsch-positiver Resultate (und damit unnötig schwacher Haupttests) zu verringern und um der alpha-Kumulation entgegenzuwirken (=Kumulation von Einzel-Irrtumswahrscheinlichkeiten in einer Testsequenz).

Sie können es bei den Voreinstellungen belassen oder diese mit Ihren individuellen Einstellungen überschreiben – Letzteres wird allerdings nur wirksam, wenn Sie anklicken „Selection of Pretesting Sequence determined by the user as shown above“.

Optional können Sie einen oder mehrere von folgenden statistischen Verfahren zur Vortestsequenz hinzuwählen:

Varianzanalyse (ANOVA oder Kruskal-Wallis-Test), **Jonkheere Terpstra Trend Test**, **Ausreißertests** (Dixon-Grubbs Test oder Hampel Test). Das Ergebnis dieser Tests ist nicht unmittelbar relevant für die Auswahl des Haupttests zur NOEC-Bestimmung, deshalb ist keiner davon programmseitig voreingestellt und Sie können diese Verfahren auch im Automatikmodus hinzuwählen (das heißt ohne anzuklicken „selection determined by the user“. Näheres zu diesen Tests erfahren Sie in Kapitel 4.7.

Nun schauen wir uns die **Haupttests** an (rechte Hälfte des Dialogfensters). Im obersten Kasten sind diejenigen Tests gelistet, die in ToxRat verfügbar sind:

Williams Test,
Dunnet Test,
Bonferroni t-Test,
Bonferroni-Welch t-Test,
Step-down-Jonkheere-Terpstra Test,
Bonferroni-Median Test,
Bonferroni-U Test

Programmseitig voreingestellt ist der Williams Test als stärkster Test. Solange jedoch der „Automatik-Modus“ aktiv ist (d.h. solange unten angeklickt ist „Selection of Final Test automatically by the program“), ist dies nur ein „Wunsch“ an das Programm – ob tatsächlich der Williams Test durchgeführt wird, hängt vom Ergebnis der Vortestsequenz ab (vergleiche dazu Abbildung 21). ToxRat erläutert die Entscheidung für einen bestimmten Haupttest im Ergebnisausschrieb. Wenn Sie – unabhängig vom Ergebnis der Vortests -

einen bestimmten Haupttest zur NOEC-Bestimmung erzwingen wollen, müssen Sie anklicken „Selection of final test determined by user as shown above“. ToxRat wird die Ergebnisse der Vortests dann berichten, unabhängig von den Ergebnissen aber mit dem von Ihnen gewünschten Haupttest fortfahren.

Jeder Test zur NOEC-Bestimmung wird standardmäßig mit einem Signifikanzniveau von 5% (0.05) durchgeführt. Entsprechend den üblichen Fragestellung in der Ökotoxikologie ist die voreingestellte Testrichtung bei metrischen Variablen „einseitig kleiner“. Auf Wunsch können Sie hier ein anderes Signifikanzniveau oder eine andere Seitigkeit einstellen. Die verwendeten Werte für Signifikanzniveau und Seitigkeit werden in der Legende der jeweiligen Testergebnisse berichtet.

Folgende optionale Einstellmöglichkeiten bei den Haupttests sind nur für erfahrene Benutzer relevant:

“Include toxic or external standard”

Neben Kontrolle, Lösungsmittelkontrolle und Behandlungen können Sie auch eine Positivkontrolle oder einen Externen Standard in den Rohdaten mitführen (vergleiche Kapitel 3.3.3). Diese(r) steht in der letzten Spalte und wird normalerweise für die Auswertungen nicht berücksichtigt - es sei denn, Sie setzen hier ein Häkchen. Dann werden die Daten aus dieser Spalte in den multiplen Test zur NOEC-Bestimmung mit einbezogen. Diese Option ist nur in Sonderfällen durch erfahrene Benutzer anzuwenden – in der Regel ist davon abzuraten, deshalb erscheint auch eine entsprechende Warnmeldung, wenn Sie das Kästchen auswählen (Abbildung 25).

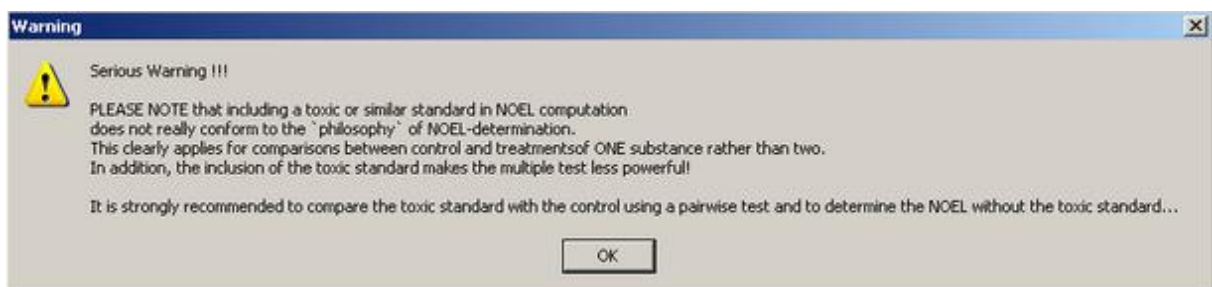


Abbildung 25: Warnhinweis bei Auswahl von „Include Toxic or External Standard“

4.4.1 NOEC-Bestimmung für quantale Daten

Vorbemerkung: Sie sehen nicht doppelt, wenn Ihnen manche Textpassagen im folgenden Abschnitt bekannt vorkommen. Um die Abschnitte für metrische und für quantale Daten jeweils in sich abgeschlossen und verständlich darzustellen, lässt es sich nicht vermeiden, manche Informationen zu wiederholen.

Verwenden Sie die folgenden Beispieldateien:

ToxRat Professional: Workbook OECD210

ToxRat Monitor: Workbook DIN EN ISO 10706

ToxRat Standard: Workbook „Testing a Quantal response 2 – Mortality replicated.xls“.

Haben Sie ein Biotest-Workbook geöffnet, gehen Sie über die Menüpunkte „Options – Hypothesis-Testing (NOEC)“, haben Sie ein Generic Workbook geöffnet, gehen Sie über den Menüpunkt „Find NOEC“ (vergleiche Kapitel 4.3). Es öffnet sich ein Fenster (Abbildung 26), in dem alle Verfahren auswählbar sind, die im Testschema zur NOEC-Bestimmung für quantale Variablen (Abbildung 22) eine Rolle spielen. Das Fenster ist unabhängig vom Workbook-Typ identisch, mit drei Ausnahmen:

1. Der grüne Variablen-Auswahlkastens (“Select variable for which adjustment applies“), ist den Biotest-Workbooks vorbehalten, da nur dort mehrere Variablen gleichzeitig ausgewertet werden können.
2. Der Kasten „Limit Testing / Two Sample Testing“ ist nur bei den Biotest-Workbooks in diesem enthalten; bei den Generic Workbooks ist er (mit identischem Inhalt) unter dem eigenen Menüpunkt „Find Limit Level“ zu finden. Wir besprechen diese Methoden in Kapitel 4.5 , „Verfahren zur Bestimmung einer Limit-Konzentration“.
3. Bei den Biotest-Workbooks bestätigen Sie Ihre Auswahlen in diesem Dialogfenster mit „okay“ (unten rechts), die vollständige Auswertesequenz starten Sie anschließend mit dem RUN-Button im Auswertefenster (vgl. Abbildung 12). Bei den Generic-Workbooks bestätigen *und* starten Sie die gewählten Einstellungen mit dem RUN-Button (unten rechts).



Gibt es mehrere Variablen in einem Workbook, so gelten für jede Variable eigene Standard-Einstellungen. Wenn Sie diese Einstellungen ändern möchten, so müssen (und können) Sie dies für jede Variable getrennt tun..

Für Anwender von ToxRat Professional und ToxRat Monitor: Stellen Sie in dem grünen Variablen-Auswahlkasten zunächst eine quantale Variable ein. OECD 210: “Hatchability”; ISO 10706: „Mortality“.

Sie sehen nun die Dialogbox „Testing Quantal Variables“ (Abbildung 26).

Das Wichtigste zuerst: das Fenster schließt unten mit einem Kasten ab, in dem Sie festlegen können, ob Sie die Auswahl der Testsequenz ToxRat überlassen wollen („automatically by the program“) oder ob Ihre eigenen Einstellungen verwendet werden sollen („determined by the user as shown above“). Nur wenn Letzteres angeklickt ist, werden Ihre Einstellungen berücksichtigt!

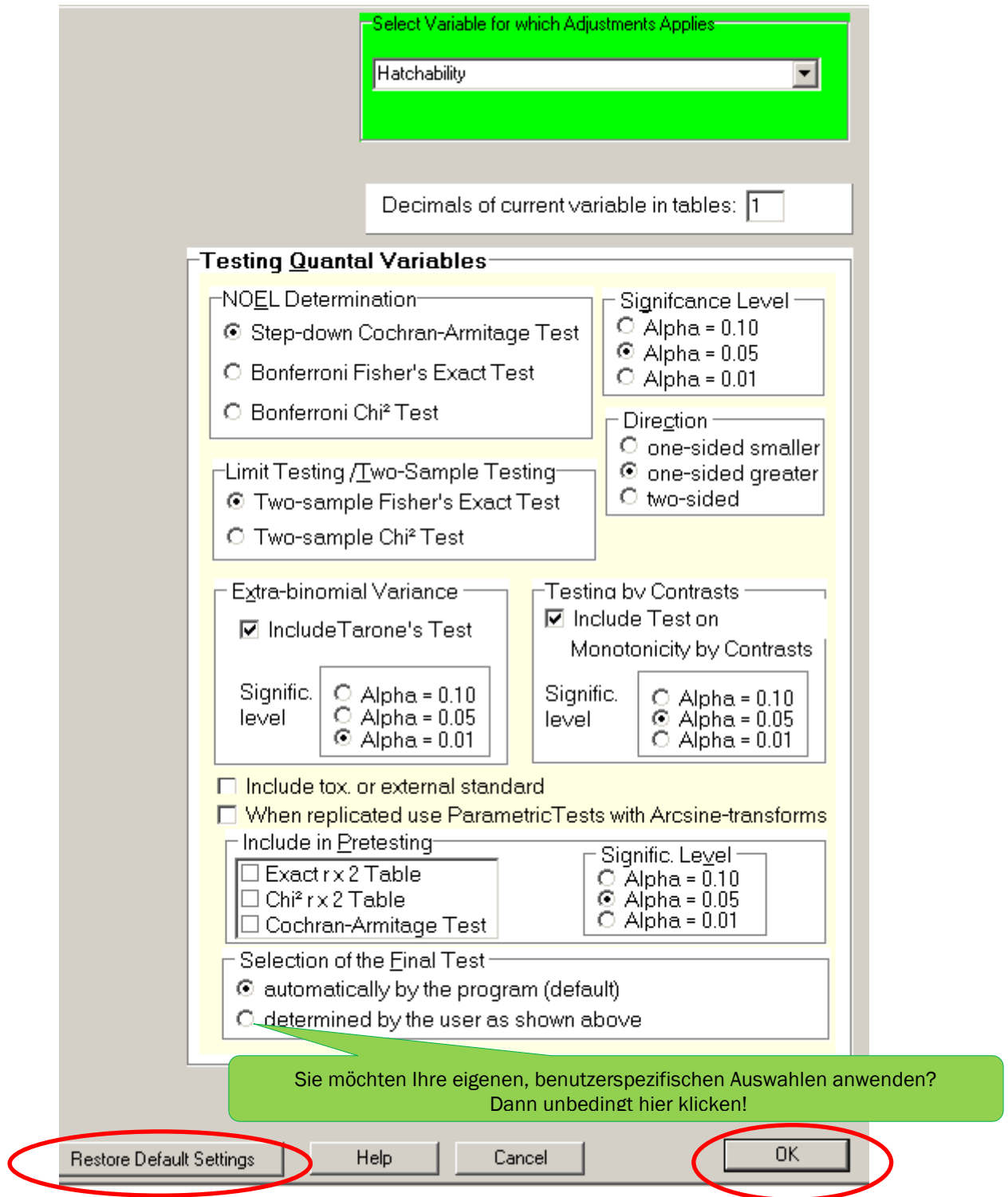


Abbildung 26: Dialogfenster NOEC Bestimmung für quantale Daten

Für die obligatorischen Tests für die NOEC Bestimmung mit quantalen Daten gibt es programmseitige Standardeinstellungen – diese sind jederzeit durch drücken des Buttons „restore default settings“ (Abbildung 26, unten) wieder herstellbar.



Ihre eigenen Einstellungen werden nur dann umgesetzt, wenn Sie den Button „determined by user as shown above“ anklicken. Andernfalls verwendet ToxRat stets seine internen Standard-Einstellungen, unabhängig davon, was im NOEC-Auswahlfenster angeklickt ist.

Achtung: dies bezieht sich ausschließlich auf die obligatorischen Testverfahren, für die ToxRat eigene Voreinstellungen vorschlägt. Zusätzliche Verfahren und Einstellungen („Include in pretesting“, „Include toxic or external standard“...) können auch im Automatikmodus hinzugewählt werden.

Entsprechend der Auswahlkriterien für einen geeigneten Test zur NOEC-Bestimmung (bitte orientieren Sie sich an Abbildung 22), sind standardmäßig **Vortests** aktiviert, die prüfen, ob eine monotone Dosis-Wirkungsbeziehung vorliegt (Test on Monotonicity by Contrasts) und ob Extra-Binomiale Varianz vorhanden ist (Tarone Test, nur möglich wenn Daten repliziert sind!). Diese Tests werden grundsätzlich zweiseitig durchgeführt, daher gibt es keine Einstellmöglichkeit für die Seitigkeit. Für den Tarone Test wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% empfohlen, um das Risiko einer falsch-positiven Entscheidung (und damit eines unnötig schwachen Haupttests) zu verringern.

Als **Haupttest** zur NOEC-Bestimmung stehen drei Tests zur Verfügung:

Step-down-Cochran-Armitage Test Ergibt der Tarone Test Hinweise auf extrabinomiale Varianz, so wird der Cochran-Armitage-Test automatisch in der Rao-Scott-Variante durchgeführt.

Bonferroni-Fisher-Exact-Test
Bonferroni-Chi2-Test

Diese beiden Tests beruhen prinzipiell auf dem gleichen Verfahren. Der Fisher – Test ist aus mathematischen Gründen ab einer bestimmten Stichprobengröße nicht mehr durchführbar. Sollte er trotzdem angewählt worden sein, erscheint ein entsprechender Hinweis, so dass die Auswertung mit dem Chi2-Test wiederholt werden kann.

Jeder Test zur NOEC-Bestimmung wird standardmäßig mit einem Signifikanzniveau von 5% (0.05) durchgeführt. Entsprechend den üblichen Fragestellung in der Ökotoxikologie ist die voreingestellte Testrichtung bei quantalen Variablen „einseitig größer“ (verglichen wird der Anteil „Tote“, „Nicht-Geschlüpfte“ oder ähnliches in Behandlungen mit der Kontrolle). Auf Wunsch können Sie hier ein anderes Signifikanzniveau oder eine andere Seitigkeit einstellen. Die verwendeten Werte für Signifikanzniveau und Seitigkeit werden in der Legende der jeweiligen Testergebissen berichtet.

Optional können Sie einen oder mehrere von folgenden statistischen Verfahren zur Vortestsequenz hinzuwählen („Include in pretesting“):

Varianzanalyse mittels Exact rx2 Table Test oder Chi2-Kontingenz-Tafel (Chi2 rx2 Table). Der Exakte Test ist teststärker, kann aber bei sehr großen Stichproben aus mathematischen Gründen nicht durchgeführt werden. In diesen Fällen ist der Chi2 Kontingenz Test anwendbar, der die Binomialverteilung über die Normalverteilung annähert.

Mit dem **Cochran-Armitage-Test** können Sie prüfen, ob die beobachteten Effekte einem signifikanten Trend folgen (zusätzlich zu dem ohnehin vorgesehenen Test auf „Monotonicity by Contrasts“). Vorher wird automatisch der Tarone Test auf Extrabinomiale Varianz durchgeführt. Falls dieser signifikant ist, wird der Cochran Armitage Test in der Rao-Scott Variante für Datensätze mit extrabinomialer Varianz durchgeführt.

Das Ergebnis dieser Tests ist nicht relevant für die Auswahl des Haupttests zur NOEC-Bestimmung, deshalb ist keiner davon programmseitig voreingestellt und Sie können diese Verfahren auch im Automatikmodus hinzuwählen (das heißt ohne anzuklicken „selection determined by the user“).

Die Option **„Include toxic or external standard“** ist erfahrenen Benutzern für bestimmte Sonderfälle vorbehalten und wird ansonsten ausdrücklich nicht empfohlen, lesen Sie hierzu bitte den entsprechenden Abschnitt zu den metrischen Variablen (Abbildung 25, Seite 41),

Transformation

Schließlich gibt es bei quantalen Daten grundsätzlich die Möglichkeit, diese – falls sie repliziert vorliegen - zu transformieren, und anschließend mit den parametrischen Tests für metrische Daten auszuwerten (vgl. Abbildung 22). Eine Datentransformation können Sie veranlassen, indem Sie im Auswahlfenster „Testing Quantal Variables“ bei der Option „When replicated use parametric Tests with Arcsin-Transformation“ ein Häkchen setzen. Dann öffnet sich zusätzlich zum Fenster für quantale Variablen auch das Fenster „Testing Metric or Transformed Variables“, das Sie bereits von den metrischen Variablen kennen (Abbildung 27). ToxRat wird die quantalen Daten nun im Hintergrund transformieren (siehe hierzu auch Kapitel 4.2) und dann mittels parametrischer Testverfahren eine NOEC bestimmen – entsprechend der programmseitigen oder Ihrer individuellen Einstellungen im Fenster „Testing Metric or Transformed Variables“ (siehe hierzu Kapitel 4.4.1.).

ToxRat Handbuch
Die Auswertung – Verfahren zur NOEC-Bestimmung

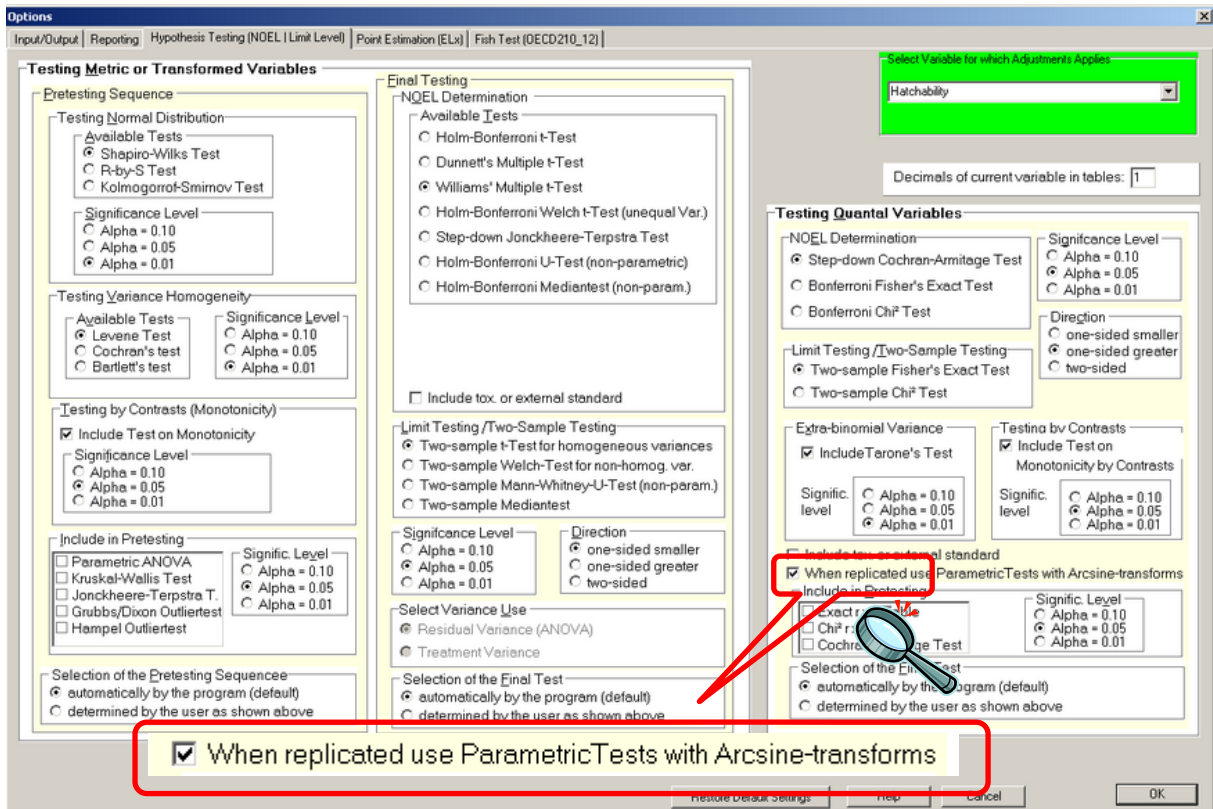


Abbildung 27: NOEC-Bestimmung bei quantalen Variablen mit Transformation



Durch die Transformation erfüllen die ehemals quantalen Daten nun die Charakteristika von metrischen Daten und die numerischen Werte kehren sich um – das heißt, je höher die gemessene Mortalität im untransformierten Datensatz, desto niedriger der numerische Wert im transformierten Datensatz. ToxRat ändert deshalb automatisch auch die Testrichtung.

4.5 Verfahren zur Bestimmung einer Limit-Konzentration / paarweises Testen

Paarweise Vergleiche kommen zum Einsatz

- wenn es neben der Kontrolle nur eine Behandlung gibt, z.B. zur Bestimmung einer Limit-Konzentration
- wenn verschiedene Behandlungen unabhängig voneinander jeweils mit einer Kontrolle verglichen werden sollen

Verwenden Sie die folgenden Beispieldateien:

ToxRat Professional: Workbook OECD210

ToxRat Monitor: Workbook DIN EN ISO 10706

ToxRat Standard: Workbook „Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls“.

Für paarweise Vergleiche gelten grundsätzlich dieselben Bedingungen und Vorüberlegungen wie bei der NOEC-Bestimmung (Vortests auf Normalverteilung und Varianzhomogenität, Signifikanzniveau, Seitigkeit), nur dass letztlich kein multipler Test, sondern ein paarweiser Test durchgeführt wird.

Bei einem **Generic Workbook** sind alle verfügbaren paarweisen Tests einzeln direkt auswählbar – dies wird in Abschnitt 4.7 „Manuelle Auswahl einzelner statistischer Verfahren“ erläutert.

Sie können die Auswahl eines geeigneten Tests aber auch ToxRat überlassen, indem Sie den Menüpunkt „Find Limit“ verwenden (Generic Workbooks) oder „Options – Hypothesis-Testing (NOEC) / Limit Level“ (Biotest Workbook). Je nach Variablentyp öffnet sich ein Fenster für quantale oder für metrische Daten (Abbildung 28 und Abbildung 29).

Ein Klick auf RUN startet die komplette Testsequenz mit abschließendem paarweisen Test (Generic Workbooks).

Bei einem **Biotest-Workbook** bestätigen Sie entweder die Voreinstellungen oder aber Ihre individuellen Auswahlen mit „okay“ und starten die gesamte Auswertung mit dem RUN-Button in der HauptMenü-Leiste.

Bitte lesen Sie nun die Abschnitte zur NOEC-Bestimmung (Kapitel 4.4) – alle dort erläuterten Hintergründe und Bedienungsschritte gelten für die oben genannten paarweisen Tests analog.

Testing Metric or Transformed Variables

Pretesting Sequence

Testing Normal Distribution

Available Tests

- Shapiro-Wilks Test
- R-by-S Test
- Kolmogorof-Smirnov Test

Significance Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Testing Variance Homogeneity

Available Tests

- Levene Test
- Cochran's test
- Bartlett's test

Significance Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Testing by Contrasts (Monotonicity)

Include Test on Monotonicity

Significance Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Include in Pretesting

- Parametric ANOVA
- Kruskal-Wallis Test
- Jonckheere-Terpstra T.
- Grubbs/Dixon Outliertest
- Hampel Outliertest

Signific. Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Selection of the Pretesting Sequence

- automatically by the program (default)
- determined by the user as shown above

Final Testing

Limit Testing /Two-Sample Testing

- Two-sample t-Test for homogeneous variances
- Two-sample Welch-Test for non-homog. var.
- Two-sample Mann-Whitney-U-Test (non-param.)
- Two-sample Mediantest

Significance Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Direction

- one-sided smaller
- one-sided greater
- two-sided

Select Variance Use

- Residual Variance (ANOVA)
- Treatment Variance

Selection of the Final Test

- automatically by the program (default)
- determined by the user as shown above

Abbildung 28: Fenster zur Auswahl paarweiser Tests für metrische Daten

Testing Quantal Variables

Significance Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Direction

- one-sided smaller
- one-sided greater
- two-sided

Limit Testing /Two-Sample Testing

- Two-sample Fisher's Exact Test
- Two-sample Chi² Test

Extra-binomial Variance

Include Tarone's Test

Signific. level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Testing by Contrasts

Include Test on Monotonicity by Contrasts

Signific. level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Include tox. or external standard

When replicated use Parametric Tests with Arcsine-transforms

Include in Pretesting

- Exact r x 2 Table
- Chi² r x 2 Table
- Cochran-Armitage Test

Signific. Level

- Alpha = 0.10
- Alpha = 0.05
- Alpha = 0.01

Selection of the Final Test

- automatically by the program (default)
- determined by the user as shown above

Abbildung 29: Fenster zur Auswahl paarweiser Tests für quantale Daten

4.6 Hemmwertbestimmung (Effect Level, ELx)

Verwenden Sie die folgenden Beispieldateien:

ToxRat Professional: Workbook OECD210

ToxRat Monitor: Workbook DIN EN ISO 10706

ToxRat Standard: Workbook „Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls“.

Workbook „Testing a Quantal response 2 – Mortality replicated.xls“.

Vorbemerkung:

Entsprechend den aktuellen Forderungen in den verschiedenen Richtlinien lautet die Voreinstellung für Hemmwertbestimmung für metrische Variablen in allen Biotest-Workbooks „nicht-lineare Regression“. Wenn Sie die lineare Regression bevorzugen, können Sie dies manuell umstellen (siehe unten, „Auswahlfenster für Hemmwert-Bestimmung“).

Je nach Applikationsform handelt es sich bei den ermittelten Effekt-Leveln (ELx) um Konzentrationen (ECx), Dosen (EDx) oder Raten (ERx). Die entsprechende Bezeichnung in den Ergebnistabellen können Sie im Menü Options / Input-output einstellen (Abbildung 30: Auswahlmöglichkeiten für Effekt-Level-Bezeichnung (Menü Options/ Input-output). Bei den Generic Workbooks lautet die Voreinstellung „ECx“ für „Konzentrationen“. Bei den Biotest Workbooks ist diejenige Bezeichnung voreingestellt, die der in der Guideline verlangten Applikationsform entspricht. In diesem Handbuch verwenden wir entweder die allgemeine Bezeichnung „Level“, oder - stellvertretend für alle Applikationsformen - die Bezeichnung „Konzentration“.

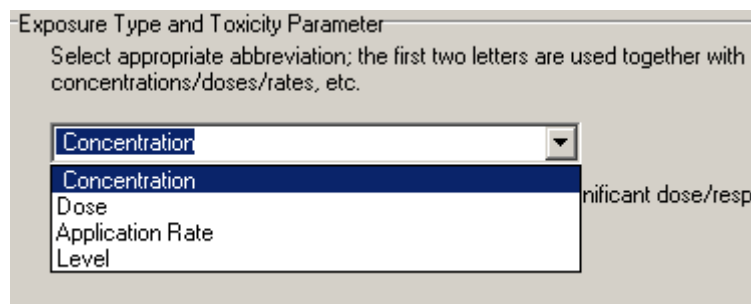
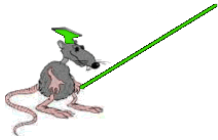


Abbildung 30: Auswahlmöglichkeiten für Effekt-Level-Bezeichnung (Menü Options/ Input-output)

Wo finden Sie das Auswahlfenster für die Hemmwertbestimmung?

Haben Sie ein Biotest Workbook geöffnet, so gehen Sie über Options / Point Estimation(ELx). Je nachdem, welche Variable im grünen Kasten oben rechts eingestellt ist, werden die verfügbaren Methoden (Linear Regression / Non-linear Regression / Interpolation) angezeigt. Aktivieren Sie die gewünschte Methode durch Klick auf die graue Schaltfläche. Diese wird dann grün unterlegt. Erst wenn das Auswahlfenster für eine Methode aktiviert ist, können darin Einstellungen vorgenommen werden. Haben Sie ein Generic Workbook geöffnet, so verwenden Sie den Menüpunkt „Find Effect Level“. Für metrische Variablen öffnet sich ein Pulldown-Menü, in dem Sie zwischen „Linear Regression“ und „Non-Linear Regression“ wählen können. Für quantale Variablen stehen „Linear Regression“ und „Interpolation“ zur Auswahl.



Hinweis für Anwender der früheren Version ToxRat 2.10.05:
Sie erreichen das Auswahlfenster für die Methoden zur Hemmwertbestimmung bei Generic Workbooks jetzt direkt über den Menüpunkt „Find Effect Level“ – der frühere (Um-) Weg über „Options“ ist nicht mehr erforderlich! Zum Starten der Berechnung klicken Sie auf den RUN Button im Auswahlfenster.

Festlegung der zu berechnenden Effekt Level, Extrapolationsfaktor

Die Interpolationsmethoden ermöglichen grundsätzlich nur die Berechnung von EL50-Werten, für die lineare und die nicht-lineare Regression hingegen können Sie im unteren Teil des Fensters bis zu sechs verschiedene, frei wählbare Effekt Level einstellen, die einschließlich Vertrauensbereichen ermittelt werden sollen (Abbildung 31). Falls Sie mehr als 6 verschiedene EL-Werte ausgegeben haben möchten, lesen Sie bitte Abschnitt 6.5.3. Für die Ausgabe von EL-Werten spielt die sogenannte Extrapolationsbremse eine wichtige Rolle. Das ist eine Voreinstellung im Programm, die dafür sorgt, dass – gemäß den Anforderungen des OECD Statistic Document 2006² – nur diejenigen ELx Werte ausgegeben werden, die innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs liegen, die also unmittelbar durch Versuchsdaten gestützt werden. Kann ein ELx-Wert nur durch Extrapolation ermittelt werden, so gibt ToxRat zunächst nur n.d. („not determined“) aus.

Sie können die Ausgabe von extrapolierten ELx-Werten jedoch erzwingen, indem Sie im Menü „Point Estimation to Calculate“ den default Wert („-1“ = keine Extrapolation) ersetzen durch einen sogenannten Extrapolationsfaktor (Abbildung 31). Wir empfehlen, zunächst eine Auswertung mit dem default-Wert „-1“ durchzuführen, um nicht unbeabsichtigt zu extrapolieren.

Point Estimates to Calculate

Choose the quantum x of ELx (e.g., enter 50 with EL50):

1. 2. 3. 4. 5. 6.

Extrapolation of an ELx

Specify the interval in which an extrapolation of the ECx shall be accepted (-1: default interval): times the spacing factor beyond the range of data

Abbildung 31: Fenster zur Auswahl der zu berechnenden Effekt Level und zur Einstellung der „Extrapolationsbremse“

In den folgenden Abschnitten lernen Sie die Einstellmöglichkeiten für die lineare und die nicht lineare Regression, sowie für die Interpolationsmethoden kennen. Details zu den mathematischen Verfahren finden Sie im Validierungsdokument, hier möchten wir Ihnen einige grundsätzliche Entscheidungshilfen für die Anwendung der Methoden an die Hand geben.

² Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data: A Guidance to Application, OECD Series on Testing and Assessment, Number 54, ENV/JM/Mono (2006) 18

4.6.1 Lineare Regression

Ziel der linearen Regression ist es, für einen nicht linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen durch Transformation einer oder beider Variablen eine lineare Abhängigkeit zu erhalten. Die lineare Regression basiert also grundsätzlich auf transformierten Daten, nicht auf den Originalmesswerten.

Wichtige Charakteristika sind:

- Setzt Normalverteilung und Varianzhomogenität bei den Daten voraus, bzw. nähert diese durch Gewichtungsfaktoren bei der Regression an
- Basiert auf transformierten Daten (siehe oben)
- für metrische Daten Normalisierung erforderlich, d.h. Messwerte werden auf Kontrolle bezogen (% Hemmung). Bei quantalen Daten gilt das nicht, da diese jeweils auf einen eigenen Startwert bezogen werden (z.B. Anteil Toter von Anzahl Eingesetzter)
- Es sind nur 2-Parameter Funktionen möglich, deshalb:
- Minimale und maximale Hemmwerte sind 0% und 100% (Näheres siehe unten)
- drei verfügbare Funktionen: Probit, Logit, Weibull (Näheres siehe unten)
- verfügbare Optimierungsalgorithmen: maximum-likelihood regression (Standard); simple linear regression, weighted linear regression (Näheres siehe unten)
- Vertrauensbereiche können direkt berechnet werden; verfügbare Verfahren hierzu sind: Methode nach Fieller (Standard), Normal Approximation, Bootstrap-Verfahren (Näheres siehe unten). Eine Varianzkorrektur (metrische Daten) bzw. Heterogenitätskorrektur (quantale Daten) ist optional möglich (Näheres siehe unten)

Für die Durchführung einer linearen Regression mit ToxRat gilt:

Bitte lesen Sie zuerst die allgemeinen Informationen zur Menüführung sowie zu generellen Einstellungen (Kapitel 4.6, Seite 49). Sie können direkt mit den default-Einstellungen eine Auswertung durchführen.

Im Folgenden stellen wir Ihnen sowohl diese Voreinstellungen als auch die Alternativen genauer vor. Sie können dann je nach Datensatz Einstellungen variieren, um eine lineare Regression zu finden, die die funktionelle Abhängigkeit der Messgröße von der Konzentration möglichst gut beschreibt (Abbildung 32, Abbildung 33).

Data Adjustment for Normal Distribution

Minimale und maximale Hemmung betragen bei der linearen Regression 0% und 100%. Hemmwerte größer 100% werden deshalb gleich 100 gesetzt, Hemmwerte kleiner Null (also Förderungen) werden gleich Null gesetzt.

Frühere Algorithmen konnten Werte von 0% und 100% nicht verarbeiten, diese wurden deshalb ersetzt durch z.B. 0,1% und 99,9%. Obwohl inzwischen aus mathematischen Gründen nicht mehr erforderlich, können Sie dieses sogenannte „Data Adjustment“ hier aktivieren, um damit z.B. frühere Auswertungen zu reproduzieren.

Verfügbare Funktionen (“Available Functions“)

ToxRat stellt drei verschiedene Zwei-Parameter-Funktionen für die Hemmwertbestimmung mittels linearer Regression zur Verfügung, jede unterstellt eine bestimmte Form der Dosis-Wirkungs-Beziehung:

- Probit, basiert auf der kumulativen Normalverteilung
- Logit, basiert auf der logistischen Funktion
- Weibull, basiert auf der Exponentialfunktion

Daneben finden Sie in diesem Fenster die Option

- Linear (straight line)

Dabei handelt es sich nicht um eine Methode zur Hemmwertbestimmung.



Die Option „Linear (straight line)“ bewirkt eine simple lineare Regression mit metrischen Originaldaten, d.h. ohne Transformation. Für quantale Daten ist die Funktion nicht auswählbar. Dieses Verfahren wird ab ToxRat 3.0 für einige Validierungsschritte benötigt (siehe Validierungsdokument). Es handelt sich also **nicht** um eine Methode zur Hemmwertbestimmung und es werden keine EC-Werte bestimmt. Sie können diese Funktion aber natürlich nutzen, um einfache lineare Regressionen mit ToxRat durchzuführen.

Linear Regression with Normalized Responses

Available Functions

Probit, Normit

Logit

Weibull

Linear (straight line)

Algorithm

Linear regression

Weighted linear regression

Linear max. likelihood regression

Use replicates while fitting

Correct variance for the covariance with the control

ECx-Confidence Limits Based on

Fieller's Theorem

Normal Approximation

Bootstrap (only replicated metric data)

Data Adjustment for Normal Distribution

In case responses are less than 0% or greater than 100%, you may wish to replace those values by ones slightly greater than 0% or smaller than 1 (Pre-set x%: you may enter a value x which replaces those <= 0% (>=100%: 100% - x).

Abbildung 32: Fenster zur Auswahl von Methoden zur linearen Regression mit metrischen Variablen. Voreinstellungen des Programms.

<p>Available Functions</p> <p><input checked="" type="radio"/> Probit, Normit</p> <p><input type="radio"/> Logit</p> <p><input type="radio"/> Weibull</p> <p><input type="radio"/> Linear (straight line)</p>	<p>Algorithm</p> <p><input type="radio"/> Linear regression</p> <p><input type="radio"/> Weighted linear regression</p> <p><input checked="" type="radio"/> Linear max. likelihood regression</p>
<p>Abbott's Correction</p> <p><input type="radio"/> Compensate for Control Response</p> <p><input checked="" type="radio"/> Dont Compensate</p>	
<p>ECx-Confidence Limits Based on</p> <p><input checked="" type="radio"/> Fieller's Theorem</p> <p><input type="radio"/> Normal Approximation</p> <p><input type="radio"/> Bootstrap (only replicated metric data)</p>	<p>Ch² Significance Level</p> <p>Hypotheses about linearity (Goodness of Fit) and parallelism are accepted if p(Ch²) is greater than: <input type="text" value="0,100"/></p>
<p><input type="checkbox"/> Data Adjustment for Normal Distribution</p> <p>In case responses are less than 0% or greater than 100%, you may wish to replace those values by ones slightly greater than 0% or smaller than 100% (Pre-set x%: you may enter a value x which replaces those <= 0% (>=100%: 100% - x). <input type="text" value="0,100"/></p>	

Abbildung 33: Fenster zur Auswahl von Methoden zur linearen Regression mit quantalen Variablen. Voreinstellungen des Programms.

Möglicherweise müssen Sie ein bisschen herumprobieren, um die Funktion zu finden, die am besten zu Ihren Daten passt (d.h. den besten Fit ergibt). Die gängigste Funktion ist die Probit-Funktion, deshalb ist diese per default voreingestellt. Die Fitqualität wird - abgesehen von der rein visuellen Beurteilung - anhand von sogenannten Gütekriterien bewertet, welche ToxRat automatisch ausgibt. Darüber hinaus prüft ToxRat auch, ob überhaupt eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegt. Mehr über diese Entscheidungshilfen erfahren Sie in Kapitel 6.3.3.

Im Bereich um den EC50 stimmen die Ergebnisse von Probit-, Logit- und Weibull-Funktion meist weitgehend überein, Unterschiede gibt es jedoch in den Endbereichen der Funktion, d.h. um EC10 und EC90.



Die Probitanalyse wurde ursprünglich für quantale Daten entwickelt. Wird sie bei metrischen Daten angewendet, berücksichtigt ToxRat bei der Regression spezielle Wichtungsfaktoren aus der Literatur. Dies gilt für die Logit- und Weibullfunktion ebenso. Weitere Informationen hierzu finden Sie im Validierungsdokument.

Algorithmus („Algorithm“)

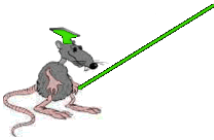
Bei der eigentlichen Prozedur des „fittens“, d.h. der Anpassung einer Funktionsgleichung an die Daten, werden die beiden Parameter a und b der Funktionsgleichung durch ein bestimmtes Rechenverfahren bestimmt. Zur Auswahl stehen

- lineare Regression (linear regression)
- gewichtete lineare Regression (weighted linear regression)
- iteratives Verfahren nach dem Maximum-Likelihood-Prinzip (linear max. likelihood regression)

Das voreingestellte maximum-likelihood-Verfahren liefert die genauesten Ergebnisse. In der Regel ist hier keine andere Einstellung erforderlich.

Fit mit Mittelwerten oder Replikaten

Bei metrischen, replizierten Daten können Sie entscheiden, ob die Fitprozedur mit den Daten-Mittelwerten oder mit den einzelnen Replikatwerten durchgeführt werden soll (Abbildung 32, „use replicates while fitting“). Sofern in der Test Guideline nichts anders vorgegeben ist, ist dieses Kästchen nicht angeklickt, d.h. die Verwendung von Mittelwerten ist Voreinstellung.



Wenn der Fit auf Basis der Mittelwerte keine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung ergibt, kann die Verwendung von Replikaten möglicherweise helfen, Signifikanz zu erzielen! Siehe hierzu auch Kapitel 6.3.3, Ergebnistabellen für ECx Bestimmung, lineare Regression)

Vertrauensbereich-Berechnung („ECx Confidence Limits Based on“)

Je nach Datenlage kann die Funktion mehr oder weniger sicher bestimmt werden. Ein Maß für die Unsicherheit der abgeleiteten Dosis-Wirkungsfunktion und somit auch für die Aussagekraft der aus ihr abgeleiteten ECx-Werte, ist der sogenannte Vertrauensbereich. Er kennzeichnet den Bereich, in dem die Funktion (bzw. die jeweiligen ECx-Werte) mit 95%iger Wahrscheinlichkeit liegen. Je sicherer die Funktion bestimmbar ist, d.h. je besser sie durch Daten gestützt wird, desto enger der Vertrauensbereich. Der Vertrauensbereich ist somit ein Maß für die Aussagekraft eines ECx-Wertes. Liegt keine ausreichende Dosis-Wirkungsbeziehung vor, kann aus mathematischen Gründen kein Vertrauensbereich berechnet werden. ToxRat gibt dann für die Vertrauensbereiche nur „n.d.“ („not determined“). Einzelheiten dazu finden Sie in Kapitel 6.3.3.

ToxRat bietet die folgenden Verfahren zur Vertrauensbereichsberechnung:

- Fieller´s Theorem (programmseitig voreingestellt)
- Normal Approximation
- Bootstrap – Verfahren (ausschließlich für metrische, replizierte Daten)

Beim Standardverfahren nach Fieller (und ebenso bei der Normal Approximation) bleibt die Kontrollvarianz wegen der Normalisierung (Division durch Kontrollwert) unberücksichtigt. Deshalb bietet ToxRat eine zusätzliche Option zur Berücksichtigung der Kontrollvarianz:

Varianzkorrektur für Vertrauensbereichsberechnung („Correct variance for the covariance of the control“, ausschließlich für metrische Daten)

Eine Option zur Berücksichtigung der Kontrollvarianz auch bei der Vertrauensbereichsberechnung nach Fieller ist ein spezieller Korrekturfaktor, wie er im Annex 5 der Testguideline OECD 201 (2006, Annex corrected 2011) für die nicht-lineare Regression beschrieben ist. Diese Option ist ab ToxRat 3.0. auch für die Vertrauensbereichsberechnung bei der linearen Regression per default stets aktiv. In der Regel werden die Vertrauensbereiche dadurch weiter.



Damit Sie die Möglichkeit haben, Ergebnisse aus früheren ToxRat-Versionen zu reproduzieren, kann die Varianzkorrektur für die Vertrauensbereichsberechnung bei metrischen Daten („Correct variance with the covariance of the control“) ausgeschaltet werden.



Wenn für den Fit die Verwendung der Mittelwerte eingestellt ist, so erfolgt auch die Vertrauensbereichsberechnung auf Basis der Mittelwerte. Dies kann in Verbindung mit der Varianzkorrektur je nach Datenlage recht weite Vertrauensbereiche ergeben. Probieren Sie deshalb alternativ die Verwendung von Replikaten aus („use replicates while fitting“ anklicken) – dies führt möglicherweise zu engeren Vertrauensbereichen!

Heterogenitätskorrektur (nur für quantale Daten)

Ein Maß für den Grad der Übereinstimmung zwischen Daten und Fit (Fitqualität, goodness of fit) ist das sogenannte „Chi² Signifikanzniveau“ $p(\text{Chi}^2)$. $p(\text{Chi}^2)$ kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei „1“ maximale Übereinstimmung bedeutet (siehe hierzu auch Kapitel 6.3.3 „Ergebnistabellen für EC_x Bestimmung, lineare Regression“). Unterschreitet $p(\text{Chi}^2)$ eine bestimmte kritische Schwelle, liegt also große Heterogenität vor, werden die Vertrauensbereiche zusätzlich vergrößert. Dies bezeichnet man als Heterogenitätskorrektur.

Der voreingestellte Schwellenwert für $p(\text{Chi}^2)$, ab dem die Heterogenitätskorrektur greift, beträgt 0,1%. Dieser Wert kann hier editiert werden.

Abbott-Korrektur (nur für quantale Daten)

Ist das entsprechende Kontrollkästchen angeklickt, so werden alle gemessenen Mortalitäten (d.h. Hemmungen) um die Kontrollmortalität verringert. Das mathematische Verfahren, mit dem dieses erfolgt, nennt man Abbott-Korrektur. Die Regressionsberechnung erfolgt dann auf Basis der korrigierten Hemmwerte.

4.6.2 Nicht-Lineare Regression

Ziel der nicht-linearen Regression ist es, den Zusammenhang zwischen zwei Variablen durch eine geeignete Funktion zu beschreiben. Im Gegensatz zur linearen Regression werden die Daten dabei nicht transformiert, d.h. es wird mit den Originalmesswerten gerechnet.

Wichtige Charakteristika sind:

- Setzt keine Normalverteilung und Varianzhomogenität bei den Daten voraus
- Basiert auf Originaldaten (siehe oben, und Beispiel in Abbildung 85)
- Keine Normalisierung metrischer Daten nötig (Normalisierung = Bezug der Messwerte auf Kontrolle → % Hemmung); Ausnahme: 2-Parameter-Funktionen
- drei verfügbare Funktionsfamilien (Cumulative distribution functions, CDF): basierend auf Normalverteilung (Normal-CDF), basierend auf logistischer Funktion (Logistic-CDF), basierend auf Weibull-Funktion (Weibull-CDF); Näheres siehe unten;
- In ToxRat sind je Funktionsfamilie 2-, 3- und 4-Parameter Funktionen möglich; je nach Anzahl der Parameter unterscheiden sich die minimalen und maximalen Werte, die in die Regression einbezogen werden. Näheres siehe unten.
- Die Daten können ungewichtet oder gewichtet in die Regression eingehen, bei Letzterem sind verschiedene Wichtungsarten möglich. Näheres siehe unten.
- In ToxRat verfügbare Optimierungsalgorithmen für die Funktion: Levenberg Marquardt (Voreinstellung), Downhill-Simplex
- Vertrauensbereichsbestimmung mittels Monte Carlo Simulation (wenn Levenberg Marquardt als Optimierungsalgorithmus gewählt; Voreinstellung) oder mittels Bootstrap-Verfahren (wenn Downhill-Simplex als Optimierungsmethode gewählt); Näheres siehe unten.



Speziell für metrische Daten ist die nicht-lineare Regression eine wichtige Alternative zur linearen Regression, da sie ohne Normalisierung auskommt (Ausnahme: 2-Parameter CDFs). Bei quantalen Daten besteht das Problem der Normalisierung nicht, deshalb ist die lineare Regression hierfür grundsätzlich eine gute Wahl. ToxRat 3.0 beinhaltet Methoden zur nicht-linearen Regression ausschließlich für metrische Daten. In zukünftigen Versionen wird die nicht-lineare Regression auch für quantale Daten verfügbar sein.

Zur Durchführung einer nicht-linearen Regression mit ToxRat lesen Sie bitte zuerst die allgemeinen Informationen zur Menüführung sowie zu generellen Einstellungen (Kapitel 4.6, Seite 49).

Die nicht-lineare Regression ist komplexer als die lineare Regression, d.h. es gibt weitaus mehr Faktoren und Einstellmöglichkeiten, die das Ergebnis beeinflussen (Abbildung 34). Insbesondere die Art der Gewichtung (siehe unten, „Further Options – Regression Type“) hat großen Einfluß auf das Ergebnis der Regression, ist aber schwer programmseitig zu standardisieren. ToxRat stellt zwar auch hier Voreinstellungen zur Verfügung, d.h. Sie können direkt mit den default-Einstellungen eine Auswertung durchführen. Je nach Datenlage müssen Sie aber möglicherweise manuell Einstellungen ändern und verschiedene Varianten ausprobieren, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

Welche Einstellungen den besten Fit für Ihre Daten ergeben, können Sie - abgesehen von der rein visuellen Beurteilung - anhand von sogenannten Gütekriterien beurteilen, welche ToxRat automatisch ausgibt. Darüber hinaus prüft ToxRat auch, ob überhaupt eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegt. Mehr über die Beurteilung des Ergebnisses erfahren Sie in Kapitel 6.3.4.



Faustregel: Wählen Sie das einfachste Modell, welches sinnvolle Ergebnisse liefert.

Abbildung 34 gibt einen Überblick über die Faktoren, die bei der nicht-linearen Regression variiert werden können. Die fett umrandeten Kästen entsprechen den Voreinstellungen des Programms: 3-Parameter-Normal CDF mit Levenberg-Marquardt Algorithmus, keine Gewichtung, Vertrauensbereiche mittels Monte-Carlo Simulation. In diesem Kapitel stellen wir Ihnen die Menüs zur nicht-linearen Regression vor und erläutern die verschiedenen Einstellmöglichkeiten.

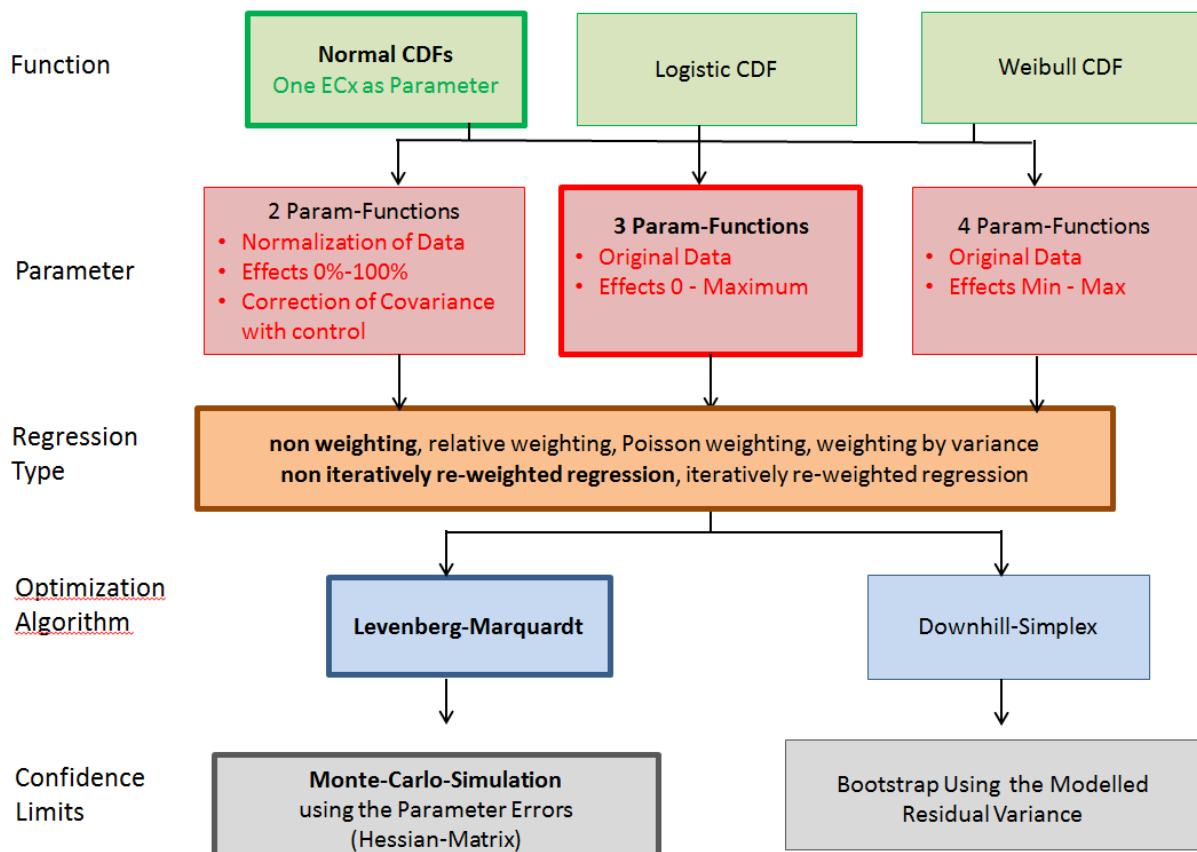


Abbildung 34: Übersicht über Verfahren der nicht-linearen Regression für metrische Daten in ToxRat. Fettgedruckt: Programmseitige Voreinstellungen

Im Hauptfenster zur nichtlinearen Regression wählen Sie die Art der verwendeten Funktion aus (Abbildung 35).

Selectable Functions

- Normal Sigmoid (2 parameters)
- Normal Sigmoid (3 parameters; Bruce Versteeg 1992)
- Normal Sigmoid (4 parameters; Bruce Versteeg 1992)
- Logistic (2 parameters)
- Logistic (3 parameters)
- Logistic (4 parameters)
- Weibull (2 parameters)
- Weibull (3 parameters)
- Weibull (4 parameters)

Start Parameter Estimates

Cntrl Mean	log10	Sigma
1,5708	0,03783	0,54720

Further Options

Abbildung 35: Auswahlfenster für verfügbare Methoden der nichtlinearen Regression; Voreinstellung: 3-Parameter Normal CDF

Verfügbare Funktionen und Startparameter

Sie haben die Wahl zwischen drei Funktionsfamilien (Cumulative distribution function = CDF):

Normal CDF (basiert auf Normalverteilung)

Logistic CDF (basiert auf logistischer Funktion)

Weibull CDF (basiert auf Weibull-Funktion)

Für jede gewählte Funktion gibt ToxRat die Startparameter für den Optimierungsalgorithmus automatisch vor. Die Startparameter sind nicht fix, sondern die jeweiligen Werte werden für jeden Datensatz individuell beim Einlesen im Hintergrund geschätzt. Bei einem Generic Workbook Metric Responses, werden die Startparameter angezeigt (siehe Abbildung 35, Kasten „Start Parameter Estimates“); bei einem Biotest-Workbook mit mehreren Variablen läuft dieser Schritt unsichtbar im Hintergrund ab. Ungeeignete Startparameter können dazu führen, dass die Regression ergebnislos abbricht, deshalb sollte die Änderung der Start-Parameter erfahrenen Benutzern vorbehalten sein. Falls Sie etwas verändert haben und dies rückgängig machen wollen: ToxRat bestimmt die Startparameter bei jedem „refresh“ neu.

Bei den Normal-CDF wird grundsätzlich einer der gewählten EC-Werte als Funktionsparameter gesetzt. In ToxRat ist dies automatisch der erste der gewählten EC-Werte (siehe Abbildung 31, Kasten „Point Estimates to calculate“).

Möchten Sie nicht automatisch den kleinsten der gewählten EC-Werte als Startparameter gesetzt haben, können Sie die EC-Werte auch in geänderter Reihenfolge eingeben.



Anzahl der Funktionsparameter

Jede der verfügbaren Funktionsfamilien kann mit entweder 2, 3 oder 4 Parametern an die Daten gefittet werden. Von der Anzahl der Funktionsparameter hängt es ab, welcher Effektbereich bzw. Datenbereich in den Fit einbezogen werden kann:

2 Parameter: 0% bis 100%

3 Parameter: 0 bis Maximum; Maximum abhängig von Originalskala

4 Parameter: Minimum bis Maximum; Minimum und Maximum abhängig von Originalskala (d.h. ein EC-Wert ist relativ, da bezogen auf die Spanne zwischen Maximum und Minimum (Spanne = 100% Effekt, Minimum = maximal erreichbarer Effekt)

Bei den 2-Parameter-Funktionen ist – ebenso wie bei der linearen Regression – eine Normalisierung der Daten erforderlich.

Programmseitig voreingestellt ist die 3-Parameter-Normal-CDF nach Bruce-Versteeg, welche in vielen Guidelines empfohlen wird.

Je komplexer die Funktion ist, mit der Ihre Daten beschrieben werden sollen, desto mehr Daten sind nötig, um sie zu ermitteln. Grundregel: es können nur so viele Parameter bestimmt werden, wie Testkonzentrationen (ohne Kontrolle) vorhanden sind.



ECx-Werte und Extrapolationsfaktor

Im Kasten „Point Estimates to Calculate“ können Sie bis zu 6 verschiedene EC-Werte festlegen, die einschließlich Vertrauensbereichen ausgegeben werden sollen. Näheres hierzu, insbesondere zum Extrapolationsfaktor, finden Sie in den allgemeinen Informationen zur Regression, Kapitel 4.6.

Haben Sie eine Funktion aus der Familie der Normal-CDF gewählt, so ist der erste hier eingestellte EC-Wert automatisch einer der Funktionsparameter. Möchten Sie nicht automatisch den kleinsten der auszugebenden EC-Werte als Startparameter gesetzt wissen, können Sie die EC-Werte auch in geänderter Reihenfolge eingeben.

Wichtig: die Vertrauensbereiche des als Parameter gesetzten EC-Wertes werden direkt anhand des Standardfehlers ermittelt und sind somit i.d.R. genauer (enger).

Further Options

Nachdem Sie die auszugebenden EC-Werte und die zu verwendende Funktion gewählt haben, können Sie die nicht-lineare Regression starten – ToxRat verwendet dann für alle weiteren Einstellmöglichkeiten default-Einstellungen. Sollte das Ergebnis nicht zufriedenstellend sein (siehe hierzu „Gütekriterien“, Kapitel 6.3.4), erreichen Sie über die Schaltfläche "Further Options" zusätzliche Einstellmöglichkeiten (Abbildung 36).

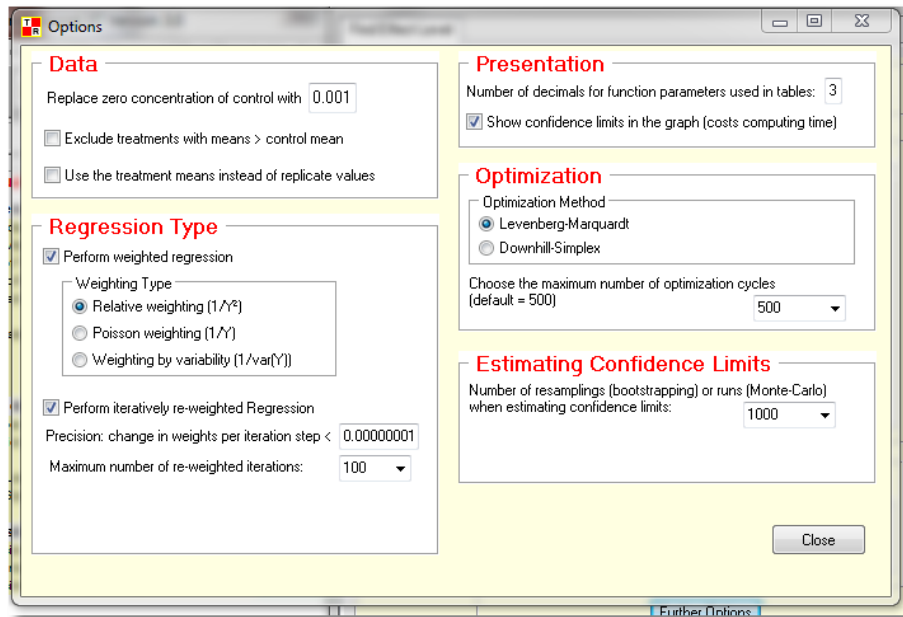


Abbildung 36: Spezielle Einstellmöglichkeiten („Further Options“) für die nichtlineare Regression; programmseitige Voreinstellungen; Achtung: „Weighted regression“ und „Perform iteratively re-weighted Regression“ ist per default nicht aktiv; hier der Vollständigkeit halber jedoch angewählt, da weitere Einstellmöglichkeiten (Precisions change, Maximum Number) sonst nicht sichtbar

Data

Replace zero concentration of control with xxx

Hier können Sie festlegen, welchen Wert Sie für die Kontrollkonzentration einsetzen möchten. Voreinstellung ist „0,001“. Wichtig: der Null-Ersatzwert muss so klein gewählt sein, dass eine weitere Reduzierung keinen Einfluss hat auf den Verlauf der Kurve. Eine einfache Möglichkeit, zu prüfen, ob der Nullersatzwert klein genug ist, ist die visuelle Kontrolle: die Kontrolldaten sollten im Plateaubereich der Kurve eingetragen sein, d.h. in dem Bereich, in dem noch keine Vertrauensbereiche sichtbar sind (für ein Beispiel siehe Abb. 85 auf Seite 102).

Ist dies nicht der Fall, sollten Sie den Wert für die Kontrollkonzentration weiter herabsetzen. Alternativ können Sie die Voreinstellung von 0,001 beibehalten und die Konzentrationen in einer anderen Dimension einsetzen (z.B. Milligramm statt Gramm).

Exclude treatments with means > control

Diese Option ist relevant, wenn in einigen Behandlungen Förderungen aufgetreten sind, so dass der Mittelwert der Behandlung größer ist als der Kontrollmittelwert. Es gibt folgende Möglichkeiten, wie mit diesen Behandlungen umgegangen wird

- Funktion einschließlich aller Messwerte fitten, d.h. die Daten aus den Behandlungen mit Förderungen in die Bestimmung der Funktionsparameter einbeziehen. Achtung: es handelt sich nicht um eine Modellierung von Hormesis (diese Option ist in ToxRat 3.0 noch nicht enthalten), sondern die gewählte Funktion bleibt unverändert (Normal CDF, Logistic CDF oder Weibull CDF) – es wird lediglich der Verlauf im oberen Kurventeil etwas im Koordinatensystem verschoben. Diese Option ist Voreinstellung (d.h. das Kästchen „Exclude treatments...“ ist deaktiviert).

- Behandlungen für die Bestimmung der Funktionsparameter weglassen. Diese Option entspricht in etwa dem Vorgehen bei der linearen Regression, Förderungen gleich Null-%-Hemmung zu setzen. In diesem Fall wird das Kästchen angeklickt.

Use the treatment means instead of the replicate values

Die nicht-lineare Regression wird in der Regel auf Basis der Einzelreplikatwerte durchgeführt. Um manche Ergebnisse aus der Literatur zu reproduzieren oder bei bestimmten Datenlagen, in denen die Anpassung auf Basis der Mittelwerte besser funktioniert, haben Sie hier die Möglichkeit, auf Mittelwerte umzustellen. Dies ist auch dann sinnvoll, wenn die Rohdaten nicht vorliegen und in den Dateneingabeblättern direkt Mittelwerte eingegeben wurden, denn für Mittelwerte erfolgt die Varianzkorrektur zur Bestimmung der Vertrauensbereiche nach einer anderen Formel als für Replikate (nur relevant bei den 2-Parameter CDFs).

Art der Regression und Gewichtung („Regression Type“)

Die nicht-lineare Regression kann mit oder ohne Gewichtung durchgeführt werden. Dabei kann auf zwei Ebenen gewichtet werden:

1. „weighted regression“

Die gemessenen Datenwerte werden gewichtet, um die Funktionswerte zu berechnen. Folgende Arten von Gewichtung sind möglich:

- Relative Wichtung ($1/Y^2$): je kleiner der absolute numerische Messwert, desto größer die Gewichtung. Hilfreich, wenn es nur wenige Werte mit großen Hemmungen gibt, zB wegen einer geringeren Anzahl an Replikaten. Diese werden dann stärker gewichtet.
- Poisson Wichtung ($1/Y$): kann sinnvoll sein für Zähldaten (Algenzellzahlen, Anzahl Nachkommen); teilweise auch für Messdaten
- Wichtung nach Varianz ($1/\text{var}(Y)$): je größer die Variabilität, desto geringer die Gewichtung. Kann hilfreich sein, wenn einige Behandlungen eine wesentlich höhere Varianz zeigen als andere.

Die Gewichtungsfunktion per default nicht eingeschaltet, denn eine Gewichtung ist kein Muss.

2. „iteratively reweighted regression“

Die erhaltenen Erwartungswerte werden schrittweise erneut gewichtet, und die Berechnung mit den geänderten Gewichtungsfaktoren solange wiederholt, bis sich die Erwartungswerte nicht mehr ändern oder bis das Abbruchkriterium (maximale Anzahl an Iterationen) erreicht ist. Ist per default nicht eingeschaltet.



Von der Art der Gewichtung, die unter „Regression Type“ eingestellt ist, kann es abhängen, ob die Regression erfolgreich ist oder nicht!

Eine Gewichtung ist kein Muss, deshalb führt ToxRat zunächst eine Regression ohne Gewichtung durch. Ergibt die Regression mit Voreinstellungen kein zufriedenstellendes Ergebnis, probieren Sie verschiedene Arten der Gewichtung aus. Je größer die Spannweite zwischen den Messwerten ist, desto größer ist der Effekt einer gewichtung. Haben Sie eine geeignete Gewichtung gefunden, kann die Berechnung mit „iteratively reweighted regression“ die Ergebnisse möglicherweise noch verbessern..

Darstellung („Presentation“)

Die Vertrauensbereichsbestimmung ist – insbesondere beim Bootstrap-Verfahren - sehr rechenintensiv und damit – je nach Rechenleistung des verwendeten Computers – möglicherweise auch zeitaufwändig. Die Abbildung des vollständigen Vertrauensbereichs in der graphischen Darstellung ist deshalb optional.

Hier können Sie außerdem festlegen, mit wie vielen Dezimalstellen die Funktionsparameter in den Ergebnistabellen dargestellt werden sollen. Falls zum Beispiel ein gefundener Parameter so klein ist, dass drei Nachkommastellen (Voreinstellung) nicht ausreichen, können Sie die Stellenanzahl hier verändern.

Optimierungsalgorithmen („Optimization“)

ToxRat bietet zwei verschiedene Algorithmen zur Ermittlung der Funktionsparameter an: Die Methode nach Levenberg-Marquardt (Voreinstellung) oder den Downhill-Simplex Algorithmus. Die Anzahl der Optimierungszyklen, die mit dem gewählten Algorithmus gerechnet werden, ist ebenfalls einstellbar. Standardmäßig werden jeweils 500 Zyklen gerechnet.

Die Levenberg-Marquardt Methode hat den Vorteil, dass damit für jeden Funktionsparameter die Standardfehler bestimmt werden, was eine direkte Vertrauensbereichsbestimmung ermöglicht. Wird z.B. nur ein EC-Wert benötigt und es ist eine Normal-CDF gewählt (d.h. der EC-Wert ist auch ein Parameter), so liefert der Levenberg-Marquardt Algorithmus automatisch den Standardfehler, aus dem der Vertrauensbereich direkt berechnet werden kann. Die Vertrauensbereiche für zusätzliche EC-Werte bzw. für alle Erwartungswerte (wenn Vertrauensbereichsdarstellung in Graphik gewünscht) werden mittels Monte Carlo Simulation bestimmt, siehe unten. Außerdem ermöglichen die Standardfehler, für jeden Funktionsparameter einen t-test auf Signifikanz durchzuführen. Deshalb ist „Levenberg-Marquardt“ Voreinstellung in ToxRat. Ist die Regression damit jedoch nicht erfolgreich, empfiehlt es sich in jedem Fall, alternativ den Downhill-Simplex-Algorithmus anzuwenden (jedoch Mindestreplikatanzahl erforderlich, siehe unten).

Vertrauensbereichsberechnung („Estimating Confidence Limits“)

Vertrauensbereiche können nicht direkt berechnet werden (Ausnahme: wenn Standardfehler bekannt, siehe oben), sondern werden durch Simulationsmethoden bestimmt.

Der Levenberg-Marquardt-Algorithmus verwendet hierzu die Monte-Carlo Simulation, der Downhill-Simplex Algorithmus das Bootstrapping-Verfahren. Die jeweilige Anzahl der Durchläufe (Monte Carlo) oder Stichprobenziehungen (Bootstrapping) können Sie hier einstellen – erfahrungsgemäß liefert ein Wert von 1000 sinnvolle Ergebnisse (Voreinstellung). Das Bootstrapping Verfahren ist sehr rechenintensiv und erst ab 6-7 Replikaten sinnvoll, da andernfalls die Vertrauensbereiche unterschätzt werden.

4.6.3 Interpolation

Bitte lesen Sie zuerst die allgemeinen Informationen zur Menüführung sowie zu generellen Einstellungen für die Hemmwertbestimmung (Kapitel 4.6, Seite 49).

Interpolationsmethoden zur Hemmwertbestimmung basieren auf der Binomialverteilung und sind deshalb nur für quantale Daten verfügbar. Sie bieten die Möglichkeit, auch dann Hemmwerte und Vertrauensbereiche abzuleiten, wenn die Datenlage für ein Regressionsverfahren nicht ausreicht. Es werden nur EC50 Werte bestimmt, Sie können also keine anderen Effektniveaus einstellen. Die EC50-Bestimmung erfolgt dabei stets mittels linearer Interpolation, wobei mit logarithmierten Konzentrationen gerechnet wird. Die Anzahl der Konzentrationen, die in die Interpolation und in die Berechnung der Vertrauensbereiche einbezogen werden, variieren je nach Methode.

Abbildung 37 zeigt die zur Verfügung stehenden Methoden und die optionalen Einstellmöglichkeiten. Die verfügbaren Interpolationsmethoden sind gemäß ihrer Zuverlässigkeit und Genauigkeit angeordnet. Sofern die Datenlage es zulässt, sollten Sie sie also in der angegebenen Priorität anwenden.

Behalten Sie entweder die Voreinstellungen bei oder treffen Sie Ihre individuelle Auswahl – anschließend starten Sie die Auswertung mit dem RUN-Button im (unten rechts im Find-Effect-Level-Fenster).

EL50 Estimate by Interpolation

Interpolation Method

- Trimmed Spearman Kaerber
- Moving Averages
- Binomial Estimation

Trimmed Spearman Kaerber Method

Percent trim requested (0 - 50%): 0

Moving Averages

Span for weighted average: 3

Abbildung 37: Auswahlfenster zur Hemmwertbestimmung für quantale Variablen mittels Interpolationsmethoden

Spearman Kärber

Die Spearman-Kärber Methode setzt eine einen konstanten spacing Faktor und eine monotone Dosis-Wirkungsbeziehung voraus. Die beobachtete Abhängigkeit wird gegebenenfalls geglättet. Enthält der Datensatz keine Behandlung mit 0% oder 100% Hemmung, so werden für die Berechnungen unter Beibehaltung des spacing-Faktors jeweils eine nächstniedrigere bzw. nächsthöhere Konzentration hinzugefügt, welche mit 0% bzw. 100% Hemmung angenommen werden. Deshalb kann rein formal auch dann eine EC50 bestimmt werden, wenn die Daten keinen 50% Hemmwert einschließen. Wie sinnvoll dies ist, sollten Sie jeweils im Einzelfall kritisch prüfen, auch vor dem Hintergrund, dass die Extrapolation von EC-Werten aus dem Datenbereich heraus generell nicht empfohlen wird³.

Der EC50 wird als gleitendes Mittel über alle Konzentrationen geschätzt, es sei denn, es wurden Konzentrationen abgeschnitten („trim“, siehe unten). Die Berechnung der Vertrauensbereiche basiert auf einer Varianzschätzung. Falls mehrere Testansätze mit 0% oder 100% Effekt vorliegen, so wird davon jeweils nur einer in die Vertrauensbereichsberechnung einbezogen.

Bei der „Trimmed Spearman-Kärber“ Variante bleiben im oberen und unteren Teil der Kurve Hemmungen bis zu bzw. ab einer bestimmten Grenze für die Ermittlung von EC50 und Vertrauensbereich unberücksichtigt. Die Grenzen, welche Hemmungen abgeschnitten werden, legen Sie im Kasten „Percent trim requested“ fest. Die Voreinstellung 0% entspricht der Original-Spearman-Kärber Methode ohne Trim. 25% bedeutet, dass nur Hemmungen zwischen 25% und 75% einbezogen werden.

Moving Average

Beim Moving Average Verfahren wird ein gleitendes Mittel über die Hemmwerte einer ausgewählten Anzahl von Behandlungen berechnet. Die Anzahl der in die Interpolation einbezogenen Behandlungen legen Sie über die sogenannte „Span“ fest. Probieren Sie es zunächst mit der voreingestellten Anzahl von „3“ – falls dies nicht zum Ergebnis führt, fordert ToxRat Sie auf, den Wert für Span zu editieren.

Eine EC50-Berechnung ist generell nur möglich, wenn die gemessenen Hemmwerte 50% einschließen.

Die Berechnung der Vertrauensbereiche basiert –genauso wie beim Spearman Kärber Verfahren - auf einer Varianzschätzung, wobei hier stets alle gemessenen Hemmwerte einfließen, also auch diejenigen, die außerhalb der gewählten „Span“ liegen.

Binomial Estimates

Beim Binomialverfahren erfolgt die Berechnung des EC-Wertes mittels linearer Interpolation zwischen den zwei gemessenen Hemmwerten, die 50% einschließen.

Die Vertrauensbereiche werden aus der kumulativen Binomialverteilung geschätzt, indem man diejenigen Testkonzentrationen als obere und untere Vertrauensbereichsgrenze ansetzt, deren kumulative Binomialwahrscheinlichkeiten 95% der Daten einschließen. Dies kann je nach Datenlage ein sehr weiter Konzentrationsbereich sein. Liegt der niedrigste gemessene Effekt deutlich über 0% oder der höchste deutlich unter 100%, so kann die untere oder obere Grenze des Vertrauensbereichs nicht ermittelt werden, weil die kumulativen Wahrscheinlichkeiten den 95% Bereich nicht abdecken.

³ Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data: A Guidance to Application, OECD Series on Testing and Assessment, Number 54, ENV/JM/Mono (2006) 18

4.7 Manuelle Auswahl einzelner statistischer Verfahren

Bitte verwenden Sie folgende Beispieldateien:

ToxRat Standard: Workbook „Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls“.

Workbook „Testing a Quantal response 1 – Mortality.xls“.

Wenn Sie gezielt einzelne Verfahren auswählen und anwenden möchten, steht Ihnen in den Generic Workbooks der Menüpunkt „Statistical Procedures“ zur Verfügung (Abbildung 38).

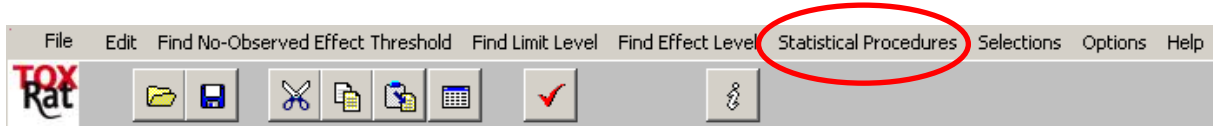


Abbildung 38: Menüpunkt „Statistical Procedures“ bei geöffnetem Generic Workbook

Einige grundsätzliche Informationen zu diesem Menüpunkt haben Sie bereits in Kapitel 4.3.2 kennen gelernt – um das Thema hier in sich geschlossen darzustellen, werden einige Informationen hier noch einmal (ausführlicher) erläutert. Anschließend lernen Sie die verfügbaren Methoden im Einzelnen kennen.

Die Überschriften im Pulldown-Menü „Statistical Procedures“ sowie die Inhalte der jeweiligen Untermenüs sind Kontext-spezifisch, d.h. je nachdem, ob Sie ein Workbook für quantale oder für metrische Daten geöffnet haben, zeigt ToxRat Ihnen die nur Methoden an, die für den jeweiligen Variablentyp und Datensatz in Frage kommen (Abbildung 39). Von den theoretisch möglichen Tests führt ToxRat dann jedoch den Test, den sie hier wählen, durch – unabhängig davon, ob die entsprechenden Voraussetzungen (vgl. Kapitel 4.4) erfüllt sind. Wenn Sie bei der Testauswahl programmseitige Unterstützung wünschen, verwenden Sie stattdessen die Menüpunkte „Find No-observed Effect treshold“ oder „Find Limit Level“.

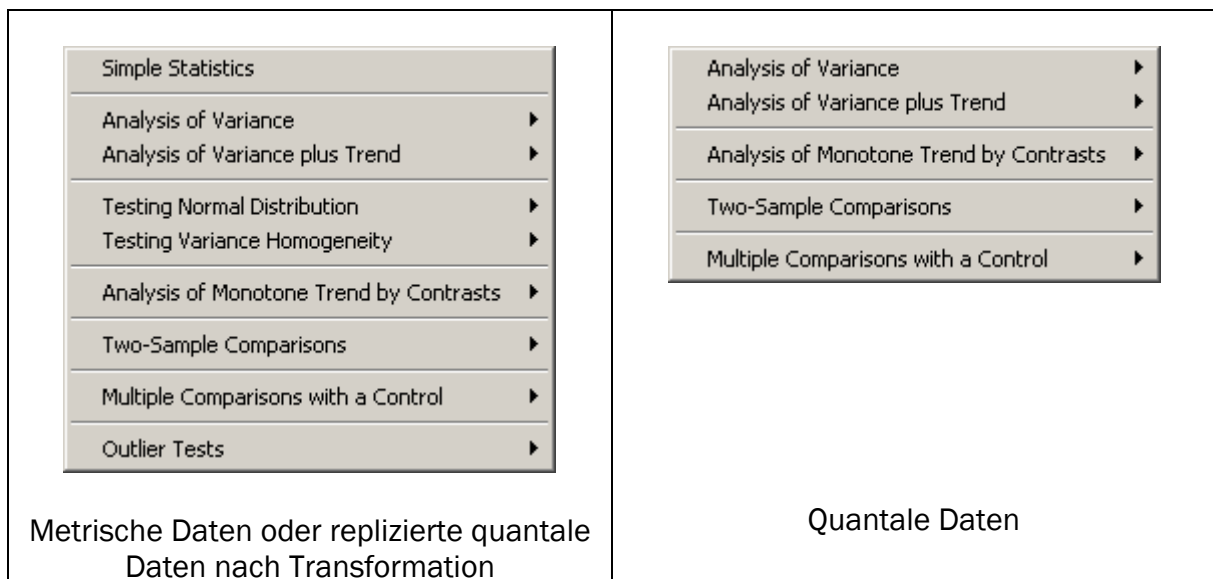


Abbildung 39: Inhalte des Pulldown-Menüs „Statistical Procedures“ für a) metrische, bzw. transformierte quantale Daten und b) quantale Daten.

Bei quantalen Daten gibt es grundsätzlich die Möglichkeit, diese – falls sie repliziert vorliegen - zu transformieren, und anschließend mit den parametrischen Tests für metrische Daten auszuwerten. Für replizierte quantale Daten werden deshalb im Menü „Statistical Procedures“ auch die Methoden für metrische Daten gelistet. Wenn Sie eine davon auswählen, führt ToxRat die vorab erforderliche Datentransformation automatisch durch. Die Ergebnistabellen enthalten dann einen Hinweis auf die Transformation. Anhand der Abbildungen Abbildung 41 bis Abbildung 48 können Sie erkennen, welches die Originalmethoden für quantale und metrische Daten sind.

Unabhängig von der gewählten Methode erzeugt ToxRat stets eine Abbildung „Messgröße gegen Zeit“.

Falls es für die statistische Methode, die Sie ausgewählt haben, Einstellmöglichkeiten gibt, öffnet sich ein Dialogfenster, in dem Sie wichtige Randbedingungen durch einen Klick auf den Radio-Button festlegen können (Abbildung 40).

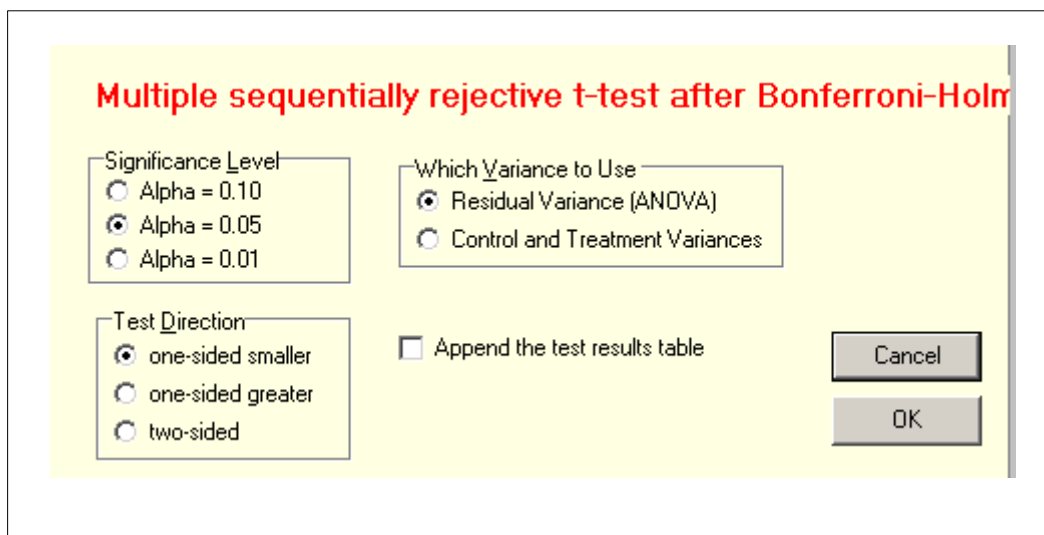


Abbildung 40: Dialogfenster für bestimmte statistische Verfahren unter „Statistical Procedures“

Voreingestellt sind das Signifikanzniveau („Significance Level“, „Alpha“, „Irrtumswahrscheinlichkeit“), die Seitigkeit („Test Direction“) und – bei manchen parametrischen Tests - die Art der verwendeten Varianz („Which Variance to Use“). Sie müssen hier nichts einstellen - wenn Sie nichts verändern, werden die programmseitigen Empfehlungen verwendet. Bei Vortests auf Normalverteilung und Varianzhomogenität liegt der empfohlene Wert für das Signifikanzniveau bei 1% (0.01). Alle anderen Tests werden standardmäßig mit einem Signifikanzniveau von 5% (0.05) durchgeführt.

Bestimmte Tests werden bedingt durch die Fragestellung grundsätzlich zweiseitig durchgeführt. In diesen Fällen ist das entsprechende Auswahlkästchen deaktiviert, d.h. diese Einstellung können Sie dann nicht verändern. Ansonsten gilt: bei metrischen Variablen ist die voreingestellte Testrichtung „einseitig kleiner“, bei quantalen Variablen wie Mortalität in der Regel „einseitig größer“. Dies können Sie bei Bedarf ändern.

Beim paarweisen und multiplen t-Test können Sie entscheiden, ob die Residual Varianz aus einer vorgeschalteten ANOVA verwendet werden soll oder die individuellen Varianzen der Kontrolle und Behandlungen. Voreingestellt ist jeweils die teststärkere Variante. Bei den meisten parametrischen Tests ist die Art der verwendeten Varianz durch den Test selbst festgelegt, dann ist der Auswahlkasten inaktiviert.

Alle in diesem Dialogfenster festgelegten Randbedingungen eines Tests werden in der jeweiligen Legende der Ergebnistabelle genannt. Ein Klick auf „ok“ startet die Auswertung.

Um Ihnen die Arbeit zu erleichtern, gibt es das Kontrollkästchen „Append the test results table“. Ist es nicht angeklickt, werden Ergebnisse früherer Auswertungen mit dem aktuellen Datensatz vor der nächsten Auswertung gelöscht und Sie bekommen nur die Ergebnisse der aktuell gewählten Auswertung angezeigt. Ist „Append the test results table“ angeklickt, werden die nächsten Ergebnistabellen zu bereits bestehenden Ergebnissen hinzugefügt.



Wenn das Kontrollkästchen „Append the test results table“ angeklickt ist, werden die nächsten Ergebnisse an diejenigen, die Sie vorher mit demselben Datensatz erzeugt hatten, angehängt. Dadurch können Sie Ergebnisse verschiedener statistischer Tests in einer Datei sammeln, speichern und abschließend in einem Gesamtreport darstellen. Andernfalls werden vorherige Ergebnisse gelöscht und nur die Ergebnisse des aktuell gewählten Verfahrens gezeigt.

4.7.1 Statistische Kenngrößen („Simple Statistics“)

Dieser Menüpunkt erzeugt eine Übersichtstabelle mit den folgenden statistischen Kenngrößen für jede Behandlung: Mittelwert, Median, Minimum, Maximum, Stichprobenumfang, Standardabweichung, Variationskoeffizient, Standardfehler, prozentualer Standardfehler, 95% Vertrauensbereich, obere und untere Vertrauensbereichsgrenzen. Nur verfügbar für metrische Daten oder replizierte quantale Daten nach Transformation.

4.7.2 Varianzanalyse („Analysis of Variance“)

<div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; margin-bottom: 5px; text-align: center;">ANOVA one-way</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; text-align: center;">Kruskal-Wallis Test</div> <p>Metrische Daten, replizierte quantale Daten nach Transformation</p>	<div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; margin-bottom: 5px; text-align: center;">Exact $r \times 2$ Table</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; text-align: center;">Chi² $r \times 2$ Table</div> <p>Quantale Daten</p>
--	---

Abbildung 41: Verfügbare statistische Methoden zur Varianzanalyse für a) metrische, bzw. transformierte Daten und b) quantale Daten.

Mittels Varianzanalyse können Sie eine generelle Aussage darüber machen, ob sich die verschiedenen Behandlungen eines Datensatzes signifikant voneinander unterscheiden oder nicht. Die Varianzanalyse erlaubt keine Aussage darüber, welche Behandlungsgruppe gegebenenfalls signifikant verschieden von der Kontrolle ist. Die Prüfung erfolgt außerdem stets zweiseitig, deshalb ist eine Varianzanalyse weniger teststark als ein einseitiger statistischer Test. Es ist also durchaus möglich, dass Sie in einem anschließenden statistischen Test Signifikanzen finden, obwohl die Varianzanalyse keinen Hinweis auf einen Effekt ergeben hat.

Für normalverteilte und varianzhomogene metrische (oder transformierte) Daten wählen Sie die einfaktorielle Varianzanalyse („ANOVA one-way“). Sind Varianzhomogenität und Normalverteilung nicht gegeben, so wenden Sie alternativ den Kruskal-Wallis-Test als nicht parametrische ANOVA an.

Das analoge Verfahren für quantale Daten ist die Exakte Kontingenztafel („Exact r x 2 Table“). Bei sehr großen Zahlen stößt dieses Verfahren an mathematische Grenzen, ToxRat gibt dann einen entsprechenden Warnhinweis aus. Wenden Sie in diesem Fall die Chi²-Kontingenztafel an („Chi² x 2 Table“) – dabei handelt es sich um eine Normalverteilungs-Annäherung der Kontingenztafel für große Zahlen.

4.7.3 Varianzanalyse plus Trendanalyse (“Analysis of Variance plus Trend“)

<div style="border: 1px solid gray; padding: 2px; width: fit-content; margin: 0 auto;">Jonckheere-Terpstra Test</div> <p>Metrische Daten, replizierte quantale Daten nach Transformation</p>	<div style="border: 1px solid gray; padding: 2px; width: fit-content; margin: 0 auto;">Cochran-Armitage Test</div> <p>Quantale Daten</p>
--	--

Abbildung 42: Verfügbare statistische Methoden zur Varianzanalyse einschließlich Trendanalyse für a) metrische, bzw. transformierte Daten und b) quantale Daten.

Mit dem Jonckheere-Terpstra Test und dem Cochran-Armitage-Test können Sie – wie mit der Varianzanalyse - prüfen, ob sich die verschiedenen Behandlungen eines Datensatzes signifikant voneinander unterscheiden oder nicht. Anders als bei der ANOVA oder Kontingenztafel kann die die Prüfung jedoch auch einseitig erfolgen, d.h. es wird vorab ein – aufsteigender oder absteigender - Trend postuliert und sodann gezielt untersucht, ob die Daten diesem unterstellten Trend signifikant folgen oder nicht.



Liegt ein Trend vor, so ist automatisch auch die für viele statistische Verfahren geforderte Bedingung der Monotonie erfüllt.
Für die Prüfung auf Monotonie stellt ToxRat außerdem die Kontrastanalyse zur Verfügung, da z.B. in der Testguideline OECD 210 explizit gefordert.

4.7.4 Tests auf Normalverteilung („Testing Normal Distribution“)

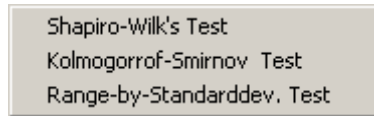


Abbildung 43: Verfügbare statistische Tests auf Normalverteilung für metrische Daten, bzw. quantale Daten nach Transformation.

Normalverteilung ist eine wesentliche Voraussetzung für sogenannte parametrische Testverfahren (vgl. z.B. Abbildung 21, Seite 35). Tests auf Normalverteilung sind deshalb nur für metrische Daten oder replizierte quantale Daten nach Transformation verfügbar. Bei Letzteren beachten Sie bitte, dass es ja Ziel der Transformation ist, Normalverteilung herzustellen. Deshalb erübrigt sich eine Prüfung auf Normalverteilung, bzw. eine etwaige gefundene Abweichung sollte kritisch bewertet werden.

Der Kolmogoroff-Smirnow-Test ist erst ab einem Stichprobenumfang von 4 durchführbar, für kleinere Stichprobenumfänge gibt es den R/S Test (Stichprobenumfang = Anzahl der Replikate in einer Stichprobe). Diese haben jedoch beide den Nachteil, dass sie jede Behandlung (= Stichprobe) separat prüfen, was Sie möglicherweise in die Schwierigkeit bringt, eine eindeutige Gesamtaussage zu treffen.

Der Shapiro-Wilks Test auf Normalverteilung ist in ToxRat voreingestellt, weil er den gesamten Datensatz als Ganzes prüft und so stets eine eindeutige Aussage liefert und weil er unabhängig ist von Stichprobengröße und -anzahl.

4.7.5 Tests auf Varianzhomogenität („Testing Variance Homogeneity“)

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px;"> Levene's Test Bartlett's Test Cochran's Test </div> <p>Metrische Daten, replizierte quantale Daten nach Transformation</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px; background-color: #e0e0ff;"> Tarone's Test (Extra Binomial Variance) </div> <p>Quantale Daten</p>
---	--

Abbildung 44: Verfügbare statistische Tests auf Varianzhomogenität für a) metrische Daten, bzw. quantale Daten nach Transformation und für b) quantale Daten.

Varianzhomogenität ist eine wesentliche Voraussetzung für sogenannte parametrische statistische Tests (vgl. z.B. Abbildung 21, Seite 35), deshalb sind mehrere Tests auf Varianzhomogenität für metrische Daten oder replizierte quantale Daten nach Transformation verfügbar. Bei Letzteren beachten Sie bitte, dass es ja Ziel der Transformation ist, Varianzhomogenität herzustellen – deshalb erübrigt sich eine Prüfung

auf Varianzhomogenität, bzw. eine etwaige gefundene Abweichung sollte kritisch bewertet werden.

Der Bartlett Test ist gedacht für normalverteilte Daten mit mehr als 10 Behandlungen, der Cochran-Test ist auch bei weniger als 10 Behandlungen anwendbar und setzt keine Normalverteilung voraus. Beide haben jedoch den Nachteil, dass sie jede Behandlung separat prüfen, weshalb Sie möglicherweise Schwierigkeiten bekommen, eine eindeutige Gesamtaussage zu treffen. Bei metrischen Daten ist der Levene-Test auf Varianzhomogenität in ToxRat voreingestellt, weil er den gesamten Datensatz als Ganzes prüft und so stets eine eindeutige Aussage liefert und weil er unabhängig ist von Stichprobengröße und -anzahl.

Bei replizierten, quantalen Daten wird mittels Tarone-Test geprüft, ob extrabinomiale Varianz vorliegt. Falls ja, wird ein nachfolgender step-down-Cochran-Armitage-Test in der sogenannten Rao-Scott-Variante durchgeführt, welche die zusätzliche Varianz berücksichtigt. Die Prüfung auf extrabinomiale Varianz und die Entscheidung, ob Rao-Scott-Variante oder nicht führt ToxRat automatisch durch, wenn ein Cochran-Armitage Test ausgewählt wird.



Da Varianzhomogenität und Normalverteilung elementare Voraussetzungen für die Verwendung teststarker Haupttests sind, empfehlen wir Ihnen für die entsprechenden Vortests eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%, um das Risiko falsch-positiver Resultate (und damit unnötig schwacher Haupttests) zu verringern. Abgesehen davon beugen Sie damit der sogenannten alpha-Kumulation vor, d.h. der Aufsummierung von Irrtumswahrscheinlichkeiten innerhalb einer gesamten Sequenz aus Vortests und Haupttest.

4.7.6 Tests auf Monotonie durch Kontrastanalyse („Analysis of Monotone Trend by Contrasts“)

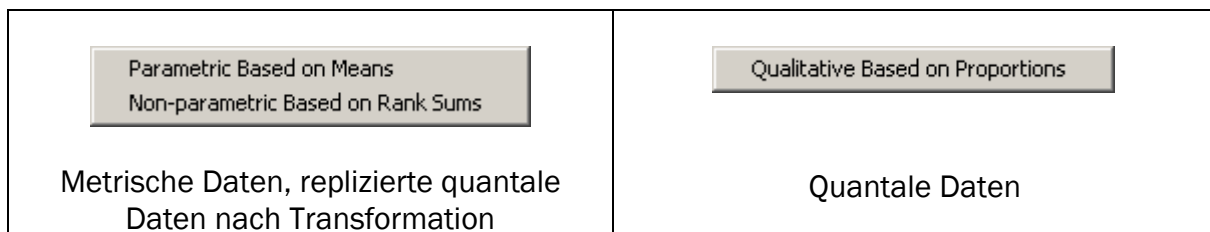


Abbildung 45: Verfügbare statistische Methoden zur Prüfung auf Monotonie für a) metrische, bzw. transformierte Daten und b) quantale Daten.

Bestimmte statistische Verfahren setzen voraus, dass die betrachtete Variable - trotz eventueller zufälliger Streuungen nach oben oder unten - grundsätzlich eine monotone Dosis-Wirkungs-Beziehung aufweist.

Ein statistisches Verfahren, um dies festzustellen, ist die Kontrastanalyse. Dabei handelt es sich um eine spezielle Variante der Varianzanalyse, mit der nicht nur geprüft werden kann, ob es überhaupt signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt, sondern auch, ob diese Unterschiede einen bestimmten Trend aufweisen. Die Kontrastanalyse wird stets zweiseitig durchgeführt.

Stark vereinfacht gesagt, werden die Originaldaten mit festgelegten Koeffizienten verrechnet, die so gewählt sind, dass sie einen postulierten Trend vorgeben. Anschließend wird geprüft, ob die resultierenden Werte (Kontraste) mit dem postulierten Muster übereinstimmen. ToxRat führt die Kontrastanalyse sowohl für lineare als auch für quadratische Kontraste durch, wie z.B. in der Testguideline OECD 210 gefordert. **Die Monotonie-Bedingung gilt als erfüllt, wenn mindestens der lineare Trend signifikant ist.** Für normalverteilte, varianzhomogene metrische Daten basiert die Kontrastanalyse auf den Mittelwerten, sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, werden die Rangsummen verwendet. Für quantale Daten werden die jeweiligen Anteile verwendet.

4.7.7 Paarweise Tests (“Two-Sample Comparisons“)

<div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> Student-t Test, Homogeneous Var. Welch-t Test (non-homogeneous var.) </div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 5px;"> Mann-Whitney U Test (Wilcoxon Rank Sum Test) Mediantest </div> <p>Metrische Daten, replizierte quantale Daten nach Transformation</p>	<div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> Fisher Exact Binomial Test Chi² Fourfold Table Text </div> <p style="text-align: center;">Quantale Daten</p>
---	--

Abbildung 46: Verfügbare paarweise Tests für a) metrische, bzw. transformierte Daten und b) quantale Daten.

Hier können Sie gezielt einen bestimmten paarweisen Test durchführen lassen. Nach Auswahl eines Verfahrens öffnet sich ein Fenster, in dem Sie die Seitigkeit und die Irrtumswahrscheinlichkeit festlegen können (vgl. Abbildung 40). Zur den Voraussetzungen und den jeweiligen Eigenschaften der verschiedenen Tests („Wann welcher Test“) lesen Sie bitte den Abschnitt zur NOEC-Bestimmung (Kapitel 4.4) – alle dort erläuterten Hintergründe zur Testauswahl gelten für die oben genannten paarweisen Tests analog. Hier werden sie allerdings nicht automatisch vom Programm geprüft.

4.7.8 Multiple Tests („Multiple Comparison with a Control“)

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> Holm's Bonnferroni t Test (homogeneous variances) Dunnett's Test Williams Test </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Holm's Bonnferroni-Welch t Test (non-homogeneous variances) Step-down Jonckheere-Terpstra Test Holm's Bonnferroni-U Test Holm's Bonnferroni-Mediantest </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> Step-down Cochran-Armitage Test Fisher's Exact Binomial Test With Bonferroni Correction Chi² Test With Bonferroni Correction </div>
Metrische Daten, replizierte quantale Daten nach Transformation	Quantale Daten

Abbildung 47: Verfügbare multiple Tests für a) metrische, bzw. transformierte Daten und b) quantale Daten.

Sollen mehrere Behandlungen mit der Kontrolle verglichen werden sollen, um z.B. eine Effektschwelle abzuleiten, kann man nicht einfach mehrere paarweise Tests hintereinander durchführen, da sich andernfalls die jeweiligen Einzel-Irrtumswahrscheinlichkeiten summieren würden (alpha-Kumulation). Stattdessen werden für diesen Zweck entweder spezielle multiple Tests eingesetzt (Dunnett-Test, Williams-Test, Step-down-Jonckheere-Terpstra-Test, Step-down-Cochran-Armitage-Test) oder paarweise Tests werden durch die sogenannte Bonferroni-Korrektur modifiziert. Die multiplen Tests stellen sicher, dass die Gesamt-Irrtumswahrscheinlichkeit für alle Vergleiche die gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit nicht übersteigt. Speziell die Bonferroni-Korrektur vermindert die Teststärke. Hinweise zur Teststärke und dazu, wann welcher Test geeignet ist, finden Sie in Kapitel 4.4 „Verfahren zur NOEC-Bestimmung (multiples Testen)“.

Nach Auswahl eines Tests öffnet sich ein Fenster, in dem Sie die Seitigkeit und die Irrtumswahrscheinlichkeit für den multiplen Test festlegen können (vgl. Abbildung 40). Hier werden die Voraussetzungen allerdings nicht automatisch vom Programm geprüft.

4.7.9 Ausreißertests („Outlier Tests“)

Test nach Grubbs/Dixon (n<26) und Grubbs/Hartley (n>25) Hampel's Test (non-parametric)

Abbildung 48: Verfügbare Ausreißertests für metrische Daten

Gelegentlich kommt es vor, dass ein Messwert nicht zu den übrigen Werten der Stichprobe passt – dann stellt sich die Frage, ob der fragliche Wert noch zur Grundgesamtheit der Daten gehört oder nicht. Wenn ja, dann handelt es sich um eine Abweichung im Rahmen der natürlichen Variabilität. Wenn nein, dann liegt ein sogenannter Ausreißer vor. Mit einem Ausreißertest wird geprüft, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Extremwert noch zur Grundgesamtheit der Daten gehört.



ToxRat führt zwar Ausreißertests durch, als Ausreißer verdächtige Werte werden jedoch programmseitig nicht eliminiert. Wenn Sie einen Wert aus dem Datensatz für weitere Auswertungen nicht berücksichtigen wollen, so müssen sie diesen manuell im Rohdaten-Eingabeblatt löschen.

Für normalverteilte Daten können Sie in ToxRat den Grubbs-Test durchführen, für nicht normalverteilte Daten den Hampel-Test. Basierend auf den Mittelwerten (Grubbs) bzw. Medianwerten (Hampel) wird für den jeweils größten und kleinsten Wert jeder Behandlung eine Prüfgröße berechnet und geprüft, ob diese innerhalb der Schranken der Grundgesamtheit liegt. Die jeweiligen Schranken sind in Abhängigkeit von der Stichprobengröße tabelliert.

ToxRat führt den Grubbs-Test je nach Stichprobenumfang automatisch in der Variante nach Dixon oder nach Hartley durch. Der Hampel-Test kann nicht durchgeführt werden, wenn mehr als 50% der Daten einer Stichprobe den gleichen numerischen Wert haben.

4.8 Umgang mit einer Lösungsmittelkontrolle

Enthält Ihr Testansatz eine Lösungsmittelkontrolle, so tragen Sie diese grundsätzlich neben der Kontrolle in die zweite Spalte der Dateneingabeblätter ein. Wählen Sie als Bezeichnung „Solvent Control“ oder auch nur „Solvent“ (siehe Abbildung 49).

Raw Data		(given as: cells/ml)						
Time	Treatment	µg/L						
96,0 h	Control	Solvent	0,038	0,068	0,12	0,21		
1			280,0	287,0	49,5	16,0	7,0	1,5
2			234,0	256,0	33,5	16,0	5,5	3,0
3			218,0	154,0	24,5	13,0	6,0	3,0
4			208,0	204,0				
5			158,0	158,0				
6			238,0	214,0				
#Replicates			6	6	3	3	3	3
Mean			222,67	212,17	35,83	15,00	6,17	2,50
Std.Dev			40,17	52,74	12,66	1,73	0,76	0,87
CV%			18,0	24,9	35,3	11,5	12,4	34,8

Abbildung 49: Dateneingabe wenn Lösungsmittelkontrolle vorhanden

Damit erkennt ToxRat, dass eine Lösungsmittelkontrolle existiert und bietet automatisch vor jeder statistischen Auswertung ein Auswahlfenster an, in dem Sie festlegen können, wie Sie mit den beiden Kontrollen verfahren wollen (Abbildung 50).

Two controls were encountered and statistically tested
Comparison between Control and solvent for Cellcount at 96 h

STUDENT-t test for Homogeneous Variances

STUDENT-t test for Homogeneous Variances with cellcount at 96 h: Two-sample comparison of the two controls. Significance was Alpha = 0,05, two-sided; Mean: arithmetic mean; n: sample size; s: standard deviation; MDD: minimum detectable difference to Control (in percent of Control); t: sample t; p(t): probability of sample t for $H_0: \mu_1 = \mu_2$; the differences are significant in case $p(t) \leq \text{Alpha}$; p(F): two-sided probability of F computed by the F-test ($H_0: \text{var1} = \text{var2}$ (homogeneity)); $p(F) > 0,01$ is the criterion of variance homogeneity. (Control(c) and treatment(t) variance was applied: $s^2(c)/nc + s^2(t)/nt$, each).

Treatm. [µg/L]	Mean	s	df	%MDD	t	p(t)	Sign.	p(F)
Control	222,7	40,17						
solvent	212,2	52,74	10	27,1	-0,39	0,706	-	0,565

+: significant; -: non-significant

Decide, which of the controls shall be the reference in further testing and computations
PLEASE NOTE: Validity criteria computations might be related to the selected type of reference!

Procedure if two controls are present:

Include both controls

Include control on 1st position only - exclude second control

Exclude control on 1st position - include second control only

Pool both controls

Ok

Abbildung 50: Auswahlfenster zum Umgang mit einer Lösungsmittelkontrolle

ToxRat präsentiert Ihnen zunächst das Ergebnis eines paarweisen Tests zwischen Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle. Bei metrischen Daten wird ein paarweiser Student-t-Test gemacht, bei quantalen Daten ein Fisher- oder Chi2-Test. Für das weitere Vorgehen stehen folgende Möglichkeiten zur Auswahl:

- Include both controls Bezugsgröße für Hemmwertberechnung und statistische Tests ist die Kontrolle, die Lösungsmittelkontrolle wird als eigenständige Behandlung in die statistischen Auswertungen einbezogen

- Include control on 1st position only - exclude second control Bezugsgröße für Hemmwertberechnung und statistische Tests ist die Kontrolle, die Lösungsmittelkontrolle wird für die statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt

- Exclude control on 1st position – include second control only Bezugsgröße für Hemmwertberechnung und statistische Tests ist die Lösungsmittelkontrolle, die Kontrolle wird für die statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt

- Pool both controls Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle werden vereinigt und bilden eine gemeinsame Bezugsgröße für die Hemmwertberechnung und statistischen Auswertungen



In Biotest-Workbooks mit mehreren Variablen erscheint für jede Variable ein eigenes Auswahlfenster zum Umgang mit der Lösungsmittelkontrolle. Sie können somit für jede Variable getrennt festlegen, wie mit der Lösungsmittelkontrolle verfahren werden soll. Datengrundlage für den paarweisen Vergleich ist stets das letzte Messintervall. Die Entscheidung, welche Kontrolle verwendet werden soll, gilt dann für die statistischen Auswertungen aller Messintervalle.



Die Validitätsprüfung erfolgt stets auf Basis der Kontrolle - unabhängig davon, welche Kontrolle als Bezugsgröße für die statistischen Auswertungen gewählt wird

4.9 Validitätsprüfung

Wenn Sie ein Biotest Workbook verwenden, so führt ToxRat automatisch eine Validitätsprüfung anhand der in der Test-Guideline festgelegten Validitätskriterien durch. Sie finden die geforderten Validitätskriterien in einem eigenen, biotestspezifischen Fenster, das im Options-Menü mit der jeweiligen Guidelinebezeichnung gekennzeichnet ist (siehe hierzu auch Kapitel 5 „Biotestspezifische Einstellungen“).

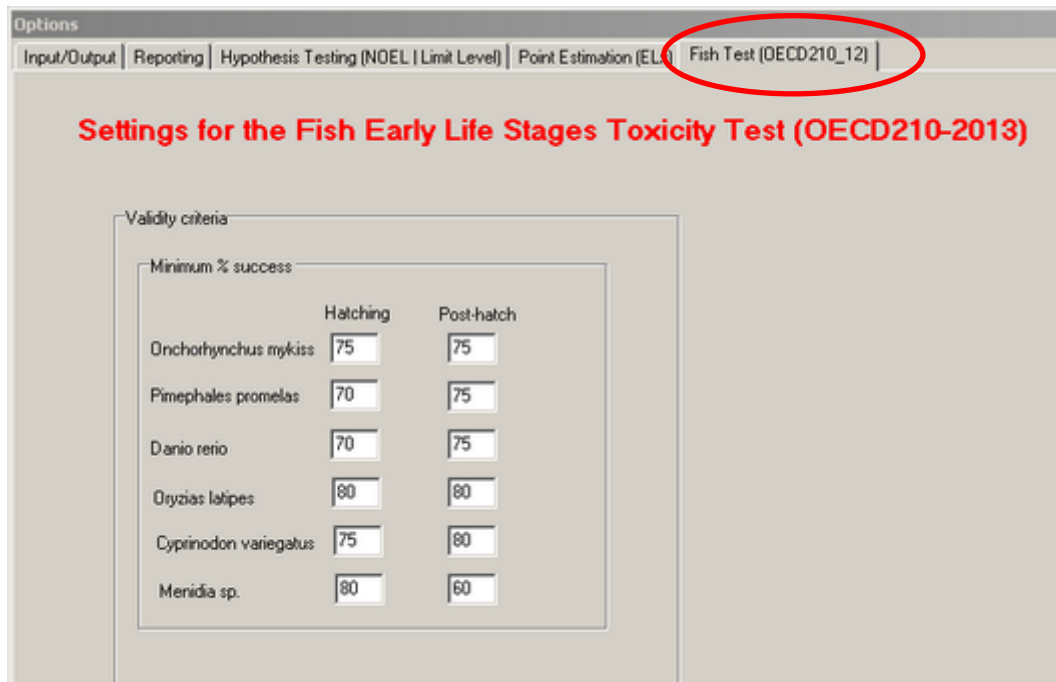
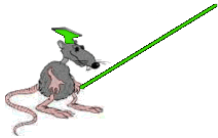


Abbildung 51: Biotestspezifisches Fenster zur Einstellung der Validitätskriterien, Beispiel OECD 210

Die in der Testguideline vorgegebenen Validitätskriterien sind voreingestellt und in der Regel müssen Sie hier auch nichts ändern. Für die Fälle jedoch, in denen die Testguideline Optionen offen lässt (z.B. bei Verwendung von nicht in der Guideline genannten Testorganismen, Bsp. OECD 201) oder wo Sie explizit andere als die vorgegebenen Werte verwenden möchten, können Sie die Validitätskriterien auch editieren. ToxRat gibt das Ergebnis der Validitätsprüfung in Form eines Vergleichs zwischen geforderten und tatsächlich erhaltenen Werten aus (Abbildung 52).

The test with Danio rerio requires a minimum hatching success of 70% and a minimum post-hatching success of 75% in the control to be valid. In the present test 95,0% and 94,7%, respectively, of the introduced fish did survive; thus the test is valid.

Abbildung 52: Ergebnis der Validitätsprüfung als Teil des Ergebnisausschriebs, Beispiel OECD 210



Für ausgewählte Biotests (z.B. OECD 201, OECD 221, ISO 20079) listet ToxRat bei der Darstellung der Validitätsprüfung sowohl die programmseitigen (d.h. die in der Guideline geforderten) Kriterien („Required“), als auch die aktuell angewendeten Kriterien („User“), so dass eventuelle Anpassungen durch den Benutzer direkt ersichtlich sind. Dies ist jedoch (noch) nicht für alle Biotests verfügbar.

Falls es für einen Biotest verschiedene Varianten nach unterschiedlichen Testguidelines gibt (z.B. Algenwachstumstest), so finden Sie die Validitätskriterien aller Guidelines im Biotest-Fenster unter Options. Relevant (und editierbar) sind jedoch nur diejenigen für das aktuelle Biotest Workbook, d.h. die aktuell verwendete Guideline. Diese sind durch einen weiß unterlegten Kasten gekennzeichnet.

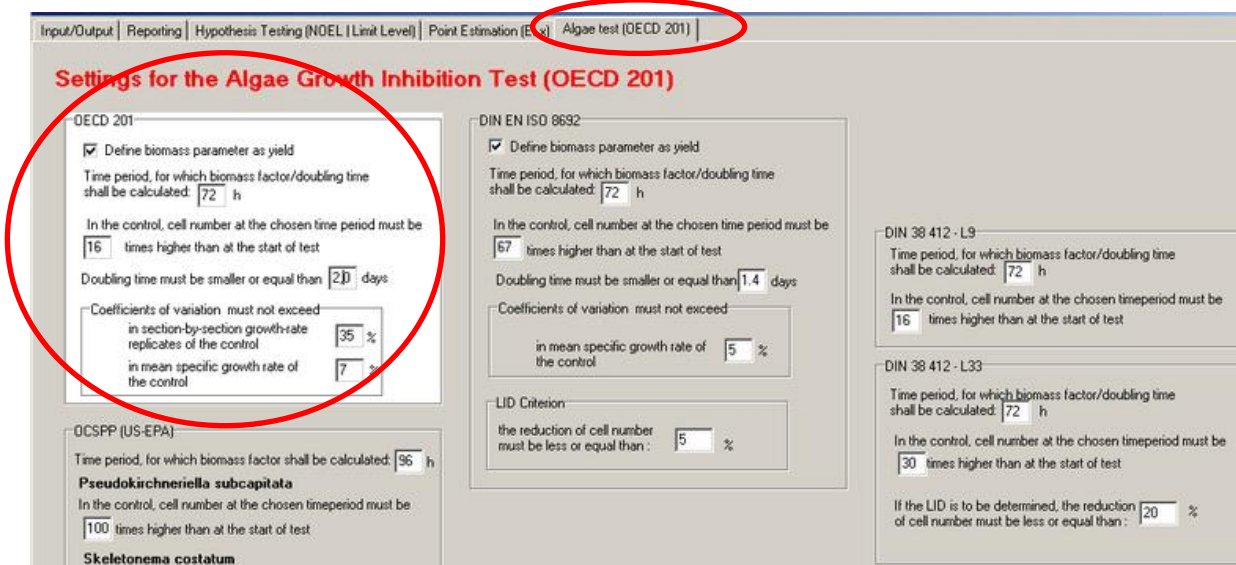


Abbildung 53: Fenster zur Einstellung der Validitätskriterien, bei Biotests, für die verschiedenen Guidelines existieren. Weiß unterlegt: Guideline des aktuell gewählten Biotest Workbooks. Beispiel Algenwachstumstest.



Die Validitätsprüfung erfolgt stets auf Basis der Kontrolle - unabhängig davon, ob eine Lösungsmittelkontrolle vorhanden ist und welche Kontrolle als Bezugsgröße für die statistischen Auswertungen gewählt wird

5 Biotestspezifische Einstellungen und Informationen

In allen Biotestworkbooks gibt es unter „Options“ eine Registerkarte mit testspezifischen Einstellungen – in der Regel sind das lediglich die Validitätskriterien, so wie sie laut Testrichtlinie definiert sind (vgl. Kapitel 4.9, Validitätsprüfung). In einigen Biotest-Workbooks können Sie spezielle Einstellmöglichkeiten für die Auswertungen wählen, haben verschiedene Workbook-Varianten zur Auswahl oder es gibt bestimmte Besonderheiten zu beachten – hierüber informiert dieses Kapitel.

5.1 Algenwachstumstest (OECD 201, OCSP 850.5400, DIN 38412, ISO 8692)

Um Ihnen die Dateneingabe und ToxRat die Darstellung zu erleichtern, können Sie die – oft sehr hohen – Werte für die Algenzellzahlen durch einen bestimmten Faktor dividieren, der im Deckblatt „General Notes“ in Zelle B11 festgelegt wird. Der default-Wert ist 10000 (Abbildung 54).

Bei allen Algentest-Workbooks enthält das Deckblatt „General Notes“ außerdem in Zelle B12 die Anzahl Messwiederholungen („repeated measurements per replicate“). Ist hier ein höherer Wert als 1 eingetragen, so interpretiert ToxRat die entsprechende Anzahl Spalten im Rohdatenblatt als Messwiederholungen ein und derselben Konzentration (Abbildung 54), die für die Auswertungen jeweils gemittelt werden. Achten Sie deshalb unbedingt darauf, dass in General Notes die korrekte Anzahl Messwiederholungen eingetragen ist. Gibt es keine Messwiederholungen, so muss hier eine „1“ stehen.

Alga, Growth Inhibition Test (OECD 201-2006/2011)								
General:	(Fill in grey - optional, don't change!)							
Test Identification/Project No.	Project 4711							
Test Item	A4711							
Unit of Test Item Concentration	mg/L							
Start of Experiment on Day								
Date and Time of the Evaluation	21.09.2004; 09							
(User area; add further items)								
Algae Counts Divided by Factor	10000							
Repeated measurements per Replicate	2							
Test design:								
	12							

0.0 h	Treatm mg/L						
	Control	Control	0.021	0.021	0.038	0.038	0.068
	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1
Replicates	6	6	3	3	3	3	3

Abbildung 54: Dateneingabe für Algenwachstumstest, wenn Messwiederholungen vorliegen (hier: Anzahl Messwiederholungen = 2)



Sollten Sie bei einem Algenwachstumstest feststellen, dass ToxRat bei der Auswertung Behandlungen „auslässt“, so prüfen Sie bitte, ob im Deckblatt „General Notes“ in Zelle B12 die korrekte Anzahl Messwiederholungen eingetragen ist. Steht hier ein zu hoher Wert, der nicht der Struktur des Dateneingabeblattes „InputRawData“ entspricht, so überspringt ToxRat beim Einlesen der Daten bestimmte Spalten, weil es sie nicht als eigene Konzentration interpretiert.

Workbook-Varianten für Algenwachstumstests

Je nachdem, ob Sie das Algenwachstums als Zellzahl, Extinktion oder Fluoreszenz ermittelt haben, wählen Sie bitte direkt eine entsprechende Dateneingabevorlage aus (gekennzeichnet mit Zusatz „cellcounts“, „extinction“ oder „fluorescence“).

In Zelle B17 des Deckblattes „General Notes“ ist festgelegt, ob die Dateneingabe direkt als Zellzahlen erfolgt oder ob Extinktionen oder Fluoreszenzen gemessen wurden, welche **ToxRat** erst noch in Zellzahlen umrechnen muss. Achtung: Hier können Sie nichts ändern (gelbe Zellcodierung!). Das heißt, in ein Workbook für Zellzahlen dürfen Sie keine Extinktionen eingeben und umgekehrt – die Daten würden nicht richtig verarbeitet werden. Die Extinktions- und Fluoreszenz- Workbooks enthalten ein zusätzliches Kalibrierungs-Datenblatt (Abbildung 55). Dieses dient dazu, die Gleichung zu ermitteln, mit der ToxRat die gemessenen Extinktions- bzw. Fluoreszenzwerte in Zellzahlen umrechnet. Tragen Sie Ihre Kalibrierungswerte bitte in die grünen Zellen ein. Wird das Workbook in MS Excel geöffnet, sehen Sie im Kalibrierungs-Datenblatt außerdem eine graphische Darstellung der Kalibrierungsbeziehung.

	A	B	C	D	E	F
1	Calibration Table Alga, Growth Inhibition Test (OECD 201)					
2				R^2 0,9995131	Qx	3,48
3	Intercept a	6,347943		r 0,9997565	Qy	3,7335524
4	Slope b	1,035587			Qxy	3,6034964
5						
6	% Cellcount	Extinction	log Extinct	log Cellcou	x*y	
7	1	14500	0,008	-2,097	4,161	-8,726
8	2	29000	0,014	-1,854	4,462	-8,273
9	3	43500	0,023	-1,638	4,638	-7,599
10	6	87000	0,045	-1,347	4,940	-6,652
11	10	145000	0,071	-1,149	5,161	-5,929
12	20	290000	0,139	-0,857	5,462	-4,681
13	30	435000	0,204	-0,690	5,638	-3,893
14	60	870000	0,407	-0,390	5,940	-2,319
15	100	1450000	0,659	-0,181	6,161	-1,116
16				-10,203	46,565	-49,188
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						

Abbildung 55: Kalibrierungsdatenblatt in Algentest-Workbooks für Extinktionen oder Fluoreszenzen.

ToxRat stellt außerdem folgende Spezial-Workbooks für besondere Test- bzw. Messdesigns zur Verfügung:

„OECD201 AlgaeGrowthInhibition(Cells 0 h – Extinction).xls“

Eingabe der Startwerte zum Zeitpunkt Null als Zellzahlen, weitere Messzeitpunkte als Extinktionswerte

„OECD201 AlgaeGrowthInhibition(Extinction duo).xls“

Ermöglicht die Eingabe verschiedener Kalibrationskurven für zwei unterschiedliche Extinktionsbereiche

Unter dem biotestspezifischen Reiter des Options-Menüs (Options – Algae Test) finden Sie neben den Validitätskriterien (vgl. Abschnitt 4.9) einen Kasten mit speziellen Optionen. Normalerweise brauchen Sie hier nichts einzustellen, anhand von Abbildung 56 können Sie sich jedoch informieren, welche zusätzlichen Optionen es gibt.

In case cellcounts have been entered, replace zero counts by a small number x of cells/mL x:

(Note that using a count division factor of 10^4 (see Generalnotes) the default value of 0.0001 is equal to 1 cell/ml)

Calculation of average growth rate begins at interval (start = 0):

Plotted Yield and Interval Growth Rate Curves start at interval (start = 0):

Time Unit with Growth Rates and Area

Days

Hours

Abbildung 56: Spezielle Einstellmöglichkeiten beim Algenwachstumstest (Menü Options – Algae Test)

5.2 Daphnienreproduktionstest (OECD 211)

Entsprechend der möglichen Versuchsdesigns (semistatisch und Durchfluss) sowie der in der Testguideline genannten optionalen Messvariablen stehen Ihnen eine Reihe verschiedener Workbooks für den Daphnienreproduktionstest zur Verfügung. Bitte wählen Sie die für Ihren Versuchstyp geeignete Vorlage aus. Sie haben in allen OECD 211-Workbooks die Möglichkeit, im biotestspezifischen Reiter des Options-Menüs (Options/Daphnia Test) verschiedene optionale Einstellungen vorzunehmen. Normalerweise brauchen Sie hier nichts einzustellen, anhand von Abbildung 57 können Sie sich jedoch informieren, welche zusätzlichen Optionen es gibt.

Validity Criteria

Please note: the offspring per survived female is always related on females present at the last day of the data set (usually day 21)

Day at which immobility and validity criteria are determined: Default: Day 21.

Immobility of females and occurrence of males in the control must not exceed %

Offspring number in the control at day 21 must be >=

Additional Options

Mean age of daphnids at start of experiment (day 0): days (necessary to determine age at first reproduction, maturation rate and the intrinsic rate more correctly)

Day from which on results of the statistical analysis are shown:

Use log with offspring numbers

Optional Variables

Include Age of First Reproduction (AFR)

Include Development Rate (1/AFR)

Include Intrinsic Rate of Increase r

Abbildung 57: Spezielle Einstellmöglichkeiten beim Daphnienreproduktionstest (Menü Options – Daphnia Test)

5.3 Chironomus Toxizitätstest (OECD 218/219)

Beim Chironomustest wird eine bestimmte Anzahl von Larven pro Behandlung eingesetzt. Im Laufe des Tests werden die Anzahlen der geschlüpften Männchen und Weibchen protokolliert.

Beim Öffnen eines Chironomus-Workbooks fragt ToxRat Sie – anders als in allen anderen Biotest-Workbooks - zunächst, ob Sie die darin enthaltenen Daten direkt auswerten oder ändern (d.h. mit neuen Daten überschreiben) möchten (Abbildung 58). Warum das so ist, erklären wir Ihnen im Folgenden. Wenn Sie die Option „Dateneingabe“ wählen, sehen Sie die Grundstruktur eines Chironomus-Workbooks, diese enthält neben dem Deckblatt „General Notes“ drei Dateneingabeblätter:

„InputRaDataAll“,
„InputRawDataMales“
„InputRawDataFemales“.

Die Anzahlen der **eingesetzten Larven** geben Sie im Datenblatt „Input RawDataAll“ für den Messzeitpunkt Null ein (grüne Zellen). Die Anzahlen der pro Beobachtungstag **geschlüpften Männchen und Weibchen** tragen Sie in die Dateneingabeblätter „InputRawDataMales“ und „InputRawDataFemales“ ein. Die jeweiligen Startwerte sowie die Summen der pro Versuchstag geschlüpften Individuen werden von ToxRat automatisch vervollständigt!

Vor der Auswertung des Datensatzes legt ToxRat für jedes Dateneingabeblatt ein zusätzliches Datenblatt mit den *kumulativen Schlupfzahlen* an (gekennzeichnet durch den Namenszusatz „-cum“), diese werden ermittelt aus den tageweisen Schlupfzahlen in den Datenblättern InputRawdataMales und InputRawDatFemales. Die Datenblätter mit den kumulativen Schlupfzahlen enthalten auch die geschlechtsspezifische Anzahl eingesetzter Larven, und zwar basierend auf der Annahme, dass jeweils 50% der eingesetzten Larven männlich bzw. weiblich waren. Alle späteren Auswertungen des Datensatzes basieren auf den Zahlen in den Datenblättern mit den kumulativen Schlupfzahlen!

Für die Auswertung des Geschlechterverhältnisses wird außerdem ein zusätzliches Datenblatt mit dem Namen „InputSexRatio“ angelegt.

Um die Auswertung zu starten, klicken Sie bitte den refresh-Button und wählen Sie in dem erneut erscheinenden Fenster die Option „Evaluation“ (Abbildung 58).

Automatische Datenkonsolidierung

Anhand der kumulativen Schlupfzahlen werden Zählfehler beim Einsetzen der Larven deutlich, denn die Summe der Geschlüpften kann nicht größer sein als die Anzahl der Eingesetzten. Deshalb gilt: sobald ein Chironomus-Workbook in ToxRat ausgewertet wird, prüft das Programm die Daten automatisch auf Konsistenz, dies wird Ihnen durch eine entsprechende Meldung angekündigt (Abbildung 59) und – nachdem Sie dies bestätigt haben – wird Ihnen auch das Ergebnis der Prüfung durch eine entsprechende Statusmeldung mitgeteilt (Abbildung 60). Wenn der Datensatz Unstimmigkeiten enthält, korrigiert ToxRat automatisch die Anzahl der Eingesetzten und trägt die korrigierten Werte in ein weiteres Zusatz-Datenblatt mit dem Namenszusatz „-corr“ ein. Die Zusatz-Datenblätter mit der Bezeichnung „_cum“ für Männchen und Weibchen (siehe oben) werden in jedem Fall angelegt (auch wenn keine Korrekturen erforderlich sind). Waren Korrekturen nötig, so finden Sie einen detaillierten Bericht hierzu im jeweiligen Datenblatt mit dem Zusatz „-cum“ im Anschluss an die kumulativen Schlupfzahlen (Abbildung 61). Die Zusatzsheets „_korr“ und „_cum“ sind auch erkennbar an dem Eintrag „sheet inserted by program“ in Zelle H1. Alle späteren Auswertungen des Datensatzes basieren auf den

Datenblättern mit den kumulativen Schlupfzahlen und den (ggfls korrigierten) geschlechtsspezifischen Anzahlen Eingesetzter!

ToxRat speichert die eingelesene und konsolidierte Datei mit den Zusatzdatenblättern automatisch mit dem Zusatz „_modified“ zum Dateinamen (im gleichen Verzeichnis wie die Originaldatei). So ist sichergestellt, dass Sie stets ein unverändertes Original-Workbook behalten, welches lediglich das Deckblatt und die drei Datenblätter für die Dateneingabe enthält (siehe oben). Natürlich können Sie die konsolidierte Datei auch selbst unter einem neuen Dateinamen abspeichern. ToxRat erkennt, wenn eine Datei geöffnet wird, die bereits Zusatzdatenblättern enthält und führt dann keine erneute Datenkonsolidierung mehr durch (Abbildung 62). Änderungen an den Rohdaten werden in diesem Fall nicht angenommen, **d.h eine bereits konsolidierte Datei kann nicht als Vorlage für neue Rohdateneingaben verwendet werden.**

Dateneingabe

Wählen Sie unter den folgenden Möglichkeiten für die Dateneingabe diejenige aus, die Ihnen persönlich am ehesten zusagt:

- Dateneingabe innerhalb von ToxRat in ein Masterbook, d.h. in eine leere Dateivorlage (Menü File – New Masterbook“, anschließend Einlesen als Workbook mittels „refresh“).
- Dateneingabe innerhalb von ToxRat oder in MS Excel in ein Demo-Workbook oder in eins Ihrer eigenen, früher benutzten Workbooks ohne Zusatzdatenblätter.
Achtung: Dateien, die aus früheren Auswertungen bereits Zusatzdatenblätter enthalten sind nicht geeignet für die Eingabe neuer Daten, weil ToxRat für diese keine erneute Datenkonsolidierung durchführt (und die neuen Daten mit refresh auch nicht einliest, siehe oben)!



ToxRat erkennt, wenn eine Datei geöffnet wird, die bereits Zusatzdatenblätter enthält und führt dann keine erneute Datenkonsolidierung mehr durch (Abbildung 62). Änderungen an den Rohdaten werden in diesem Fall nicht angenommen, d.h eine bereits konsolidierte Datei kann **nicht** als Vorlage für neue Rohdateneingaben verwendet werden.

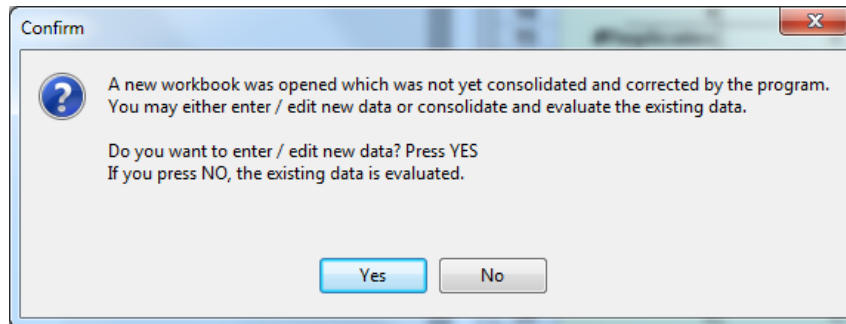


Abbildung 58: Automatische Abfrage beim Öffnen eines Chironomus-Workbooks

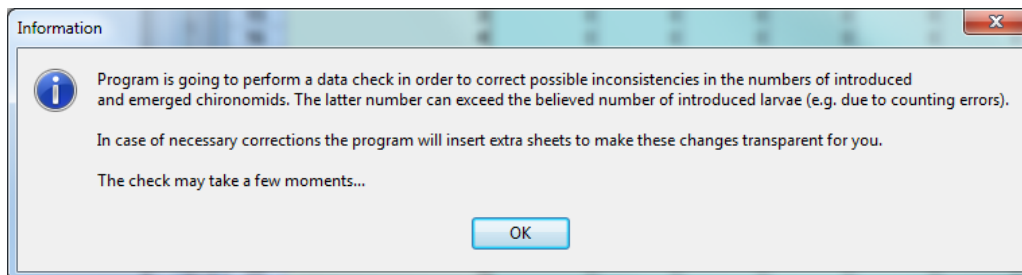


Abbildung 59: Automatische Meldung vor Beginn der Auswertung eines Chironomus-Workbooks.

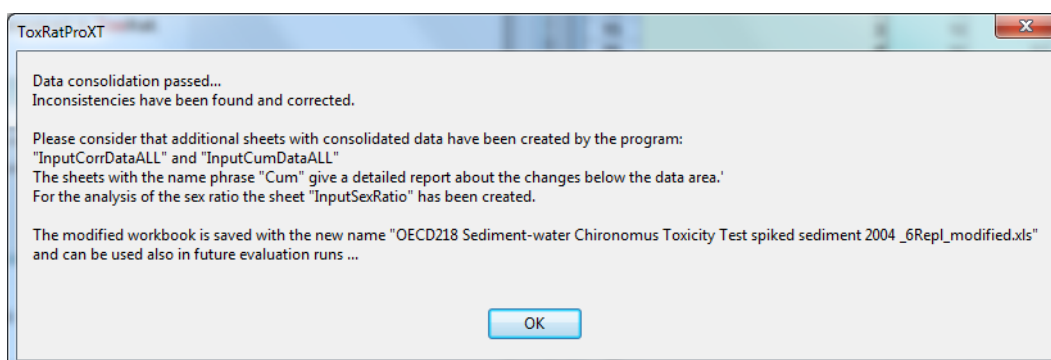
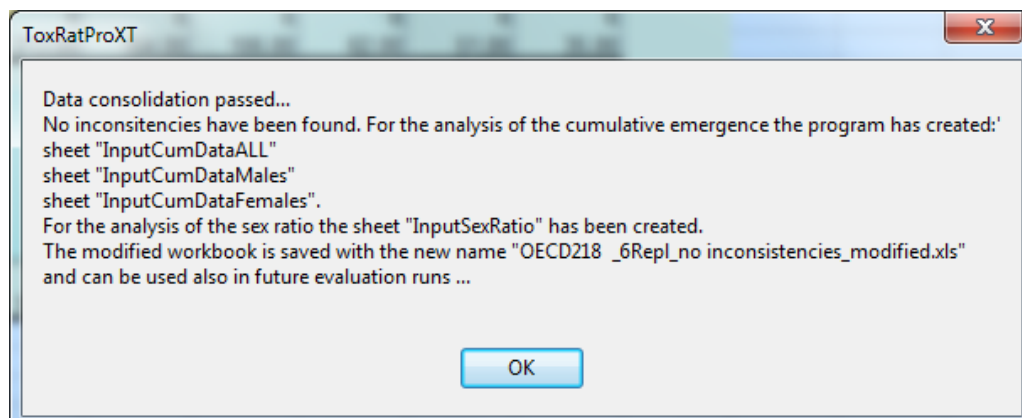


Abbildung 60: Statusmeldung über das Ergebnis der von ToxRat automatisch durchgeführten Datenkonsolidierung für einen Chironomusdatensatz. Beispiel für Datensatz ohne Inkonsistenzen (oben) und mit Inkonsistenzen (unten).

140	4	19	18	12	7	4	4
141	#Replicates	4	4	4	4	4	4
142	#Emerged	70,00	71,00	54,00	36,00	28,00	20,00
143							
144	Report About Data Consolidation						
145	Variables:						
146	- Cumulative Emergence (All)						
147	- Emergence (All, Corrected)						
148	Consolidation Method:						
149	In case more emerged than introduced chironomids are found,						
150	the number of introduced is replaced by the number of emerged chironomids.						
151	This is the only chance to calculate emergence rates and their toxic metrics.						
152	The Development Rate/Time and Sex Ratio remain unaffected by this consolidation.						
153	The changes made by the program do only affect the number of introduced larvae.						
154	All remaining data remain unchanged.						
155	Corrections are protocoled below and the change of data is indicated by bold numbers.						
156	Sheet 4 (InputCumDataAll) Row 4 Col 5 Introduced Number 20 replaced by total emerged number 21						
157	Sheet 3 (InputCorrDataAll) Row 4 Col 5 Introduced Number 20 replaced by total emerged number 21						
158							

Abbildung 61: Beispiel für einen Programmbericht über eine durchgeführte Datenkonsolidierung im Chironomus-Workbook (zu finden in den Datenblättern mit Zusatz „_cum“, unterhalb der Rohdaten).

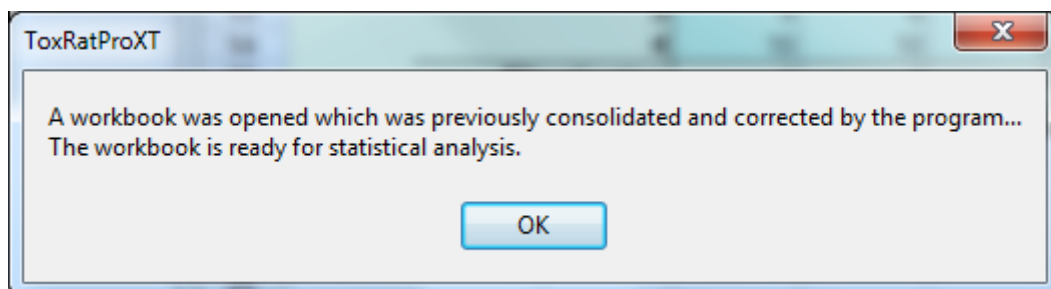


Abbildung 62: Meldung beim Öffnen einer Datei mit dem Namenszusatz „_modified“ bzw. generell einer Datei, die bereits Zusatzsheets aus einem früheren Konsolidierungsprozess enthält.

Auch für den Chironomustest gibt es optionale Einstellmöglichkeiten wie z.B. eine Auswertung des Geschlechterverhältnisses und eine geschlechtsspezifische Auswertung der Emergenzraten. Eine Übersicht finden Sie in Abbildung 63.

Settings for the Chironomid Toxicity Test (OECD218/219)

Used Development Parameter

Development Rate

Development Time

Estimate separate emergence rates for males or females
(Change requires clicking the the refresh button)

Analyse the sex ratio

Age of the introduced larve (days):
(used to correct the developmental time or rate)
(Change requires clicking the the refresh button)

Test is valid if emergence in the control is higher than % of the introduced larvae

Preferred last day

Day 28, independently of real study termination

Day of study termination

Abbildung 63: Spezielle Einstellmöglichkeiten beim Chironomustest (Menü Options – Chironomid Test)

6 Das Ergebnis

Oder: Was finden Sie wo und was bedeutet es?

Unsere Beispieldateien sind:

ToxRat Professional: Workbook OECD210

ToxRat Monitor: Workbook DIN EN ISO 15088

ToxRat Standard: „Testing a Metric response 3 at several Intervals.xls“.

ToxRat liefert Ergebnisse als Graphiken und Tabellen. Dieses Kapitel soll Ihnen helfen, sich zurechtzufinden („Was finden Sie wo..“) und die Ergebnisse der verschiedenen statistischen Verfahren zu verstehen und zu interpretieren („... und was bedeutet es?“).

Starten Sie die Auswertung mit RUN (Biotest-Workbook) bzw. führen Sie eine Dosis-Wirkungs-Analyse durch (Generic Workbook). Unabhängig davon, welches Workbook Sie verwenden oder welche statistische(n) Methode(n) Sie angewendet haben, gilt: Nach jeder Auswertung sehen Sie zuerst ein Fenster, in dem alle Graphiken gezeigt werden, die zu der jeweiligen Auswertung verfügbar sind. Dies gibt Ihnen einen schnellen, visuellen Eindruck von den Ergebnissen, ehe Sie sich gezielt in bestimmte Tabellen vertiefen.

Wir kommen später darauf zurück - schließen Sie dieses Fenster nun bitte vorerst wieder (Schaltfläche „Close“ oder Kreuzchen oben rechts im Fenster) und folgen Sie uns durch die verschiedenen Inhalte des Ergebnisbildschirms.

6.1 Menüs und Buttons im Ergebnis-Bildschirm

Sobald ToxRat eine Auswertung durchgeführt hat, erscheinen neue Menüpunkte und Buttons für die Auswertung in der Menüleiste (Abbildung 64).

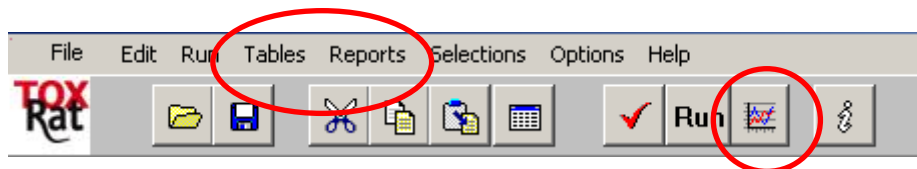


Abbildung 64: Menüleiste im Ergebnisbildschirm

Neu hinzugekommene Menüpunkte für die Ergebnisdarstellung sind:

Tables

Liste aller Daten- und Ergebnistabellen, sowohl für die Messvariablen, als auch für die daraus abgeleiteten Variablen wie Yields, Wachstumsraten. Mehr dazu in Abschnitt 6.3, Tabellen.

Reports

Öffnet das Fenster für die Reporterstellung. Da Reports nur anhand der Ergebnisse einer unmittelbar vorangegangenen Auswertung erstellt werden können, gibt es diesen Menüpunkt nur hier. Näheres zur Reporterstellung finden Sie in Abschnitt 7.



Öffnet das Graphikfenster erneut. Näheres zu den Graphiken finden Sie in Abschnitt 6.2.

6.2 Graphiken

Nach jeder Auswertung zeigt ToxRat zuerst ein Fenster mit allen Graphiken, die zu der jeweiligen Auswertung verfügbar sind (Abbildung 65). Sie können das Fenster jederzeit schließen, indem Sie auf die Schaltfläche „Close“ oder das Kreuzchen oben rechts klicken und wieder öffnen, indem Sie auf den Graphik-Button in der Menüzeile klicken.



Graphiken werden nur direkt aus einer unmittelbar vorhergehenden Auswertung erzeugt. Sie werden automatisch gelöscht, sobald das Workbook geschlossen wird. Beim Abspeichern eines Workbooks sind nur Tabellen enthalten, niemals Graphiken. Um Graphiken zu speichern, erzeugen Sie entweder einen Report (vgl. Kapitel 7), oder verwenden Sie die Speicherfunktion im Graphik-Editiermodus.

Es gibt grundsätzlich zwei Arten von Graphiken: zum einen die Auftragung Messvariable gegen Zeit, zum zweiten das Ergebnis der gewählten Dosis-Wirkungsanalyse mittels linearer oder nicht linearer Regression. Bei Biotest-Workbooks mit mehreren Variablen können Sie durch Anklicken der jeweiligen Reiter zwischen den Variablen hin und her wechseln.

The screenshot shows the 'ToxRat Professional X-Graphs Overview' window. At the top, there are tabs for 'Hatchability', 'Post-hatch survival', 'Fresh weight', and 'Dry weight'. The main area displays several graphs: 'Post-hatch survival Curves' (a line graph of Fraction Survived vs Time [d]), 'Post-hatch survival Response Curve 14 d', 'Post-hatch survival Response Curve 21 d', and 'Post-hatch survival Response Curve 35 d' (all showing % Post-hatch Mortality vs Concentration [mg/L]). A control panel at the bottom left contains buttons for 'Report (RTF format)', 'Report (PDF-format)', 'Report (only graphs, PDF)', and 'Close'. Callouts provide instructions: 'Bei Biotest-Workbooks: Je ein Reiter pro Variable', 'Abbildung Variable gegen Zeit', 'Ergebnis der gewählten Dosis-Wirkungs-Analyse. Je eine Graphik pro Messzeitpunkt', 'Direktzugang zum Reportmenu. Alternativ: Schaltfläche in Menüzeile', 'Fenster schließen, jederzeit wieder aufrufbar durch Button in Menüzeile', and 'Klick auf Graphik öffnet Edit-Tool'.

Abbildung 65: Aufbau des Graphikfensters

Graphiken editieren

Um in den Editiermodus für die Graphiken zu gelangen, klicken Sie die betreffende Graphik an – diese erscheint dann vergrößert und mit einer eigenen Menüzeile (Abbildung 66). Über den Menüpunkt „Edit“ können Sie z.B. Achsenbeschriftungen oder Skalierungen ändern und vieles mehr (Abbildung 67). Der Editor ist selbsterklärend – probieren Sie die einzelnen Punkte einfach aus. Es handelt es sich jedoch nur um einen relativ einfachen Graphikeditor. Wenn Sie anspruchsvollere Darstellungen benötigen, z.B. für Publikationen, dann haben Sie die Möglichkeit, die Daten, aus denen die Graphik erzeugt wurde, zu exportieren und mit einem externen Programm zu verarbeiten (Abbildung 68).

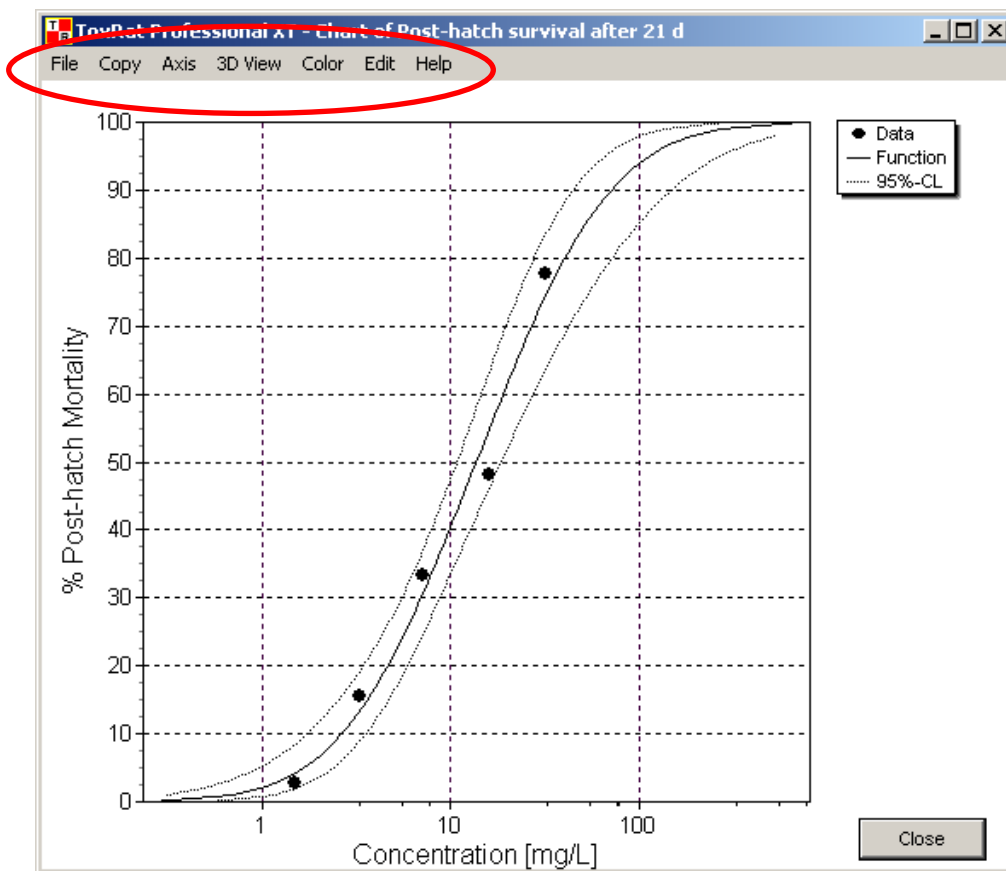


Abbildung 66: Editiermodus für Graphiken - Überblick

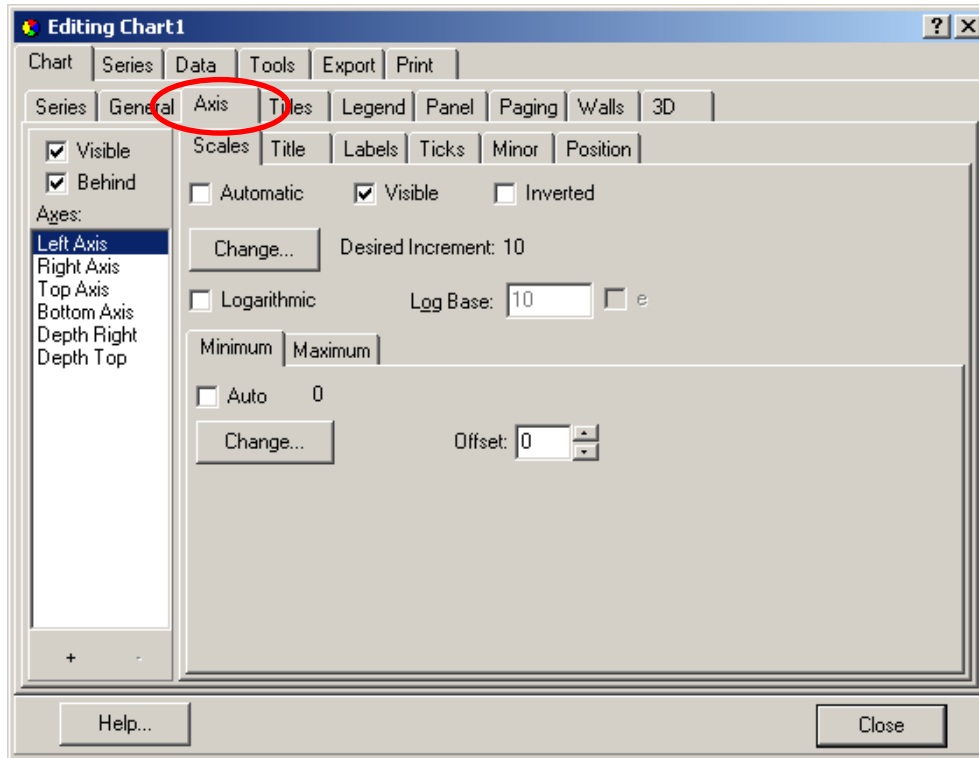


Abbildung 67: Editiermodus für Graphiken – Achsen (Edit – Axis)

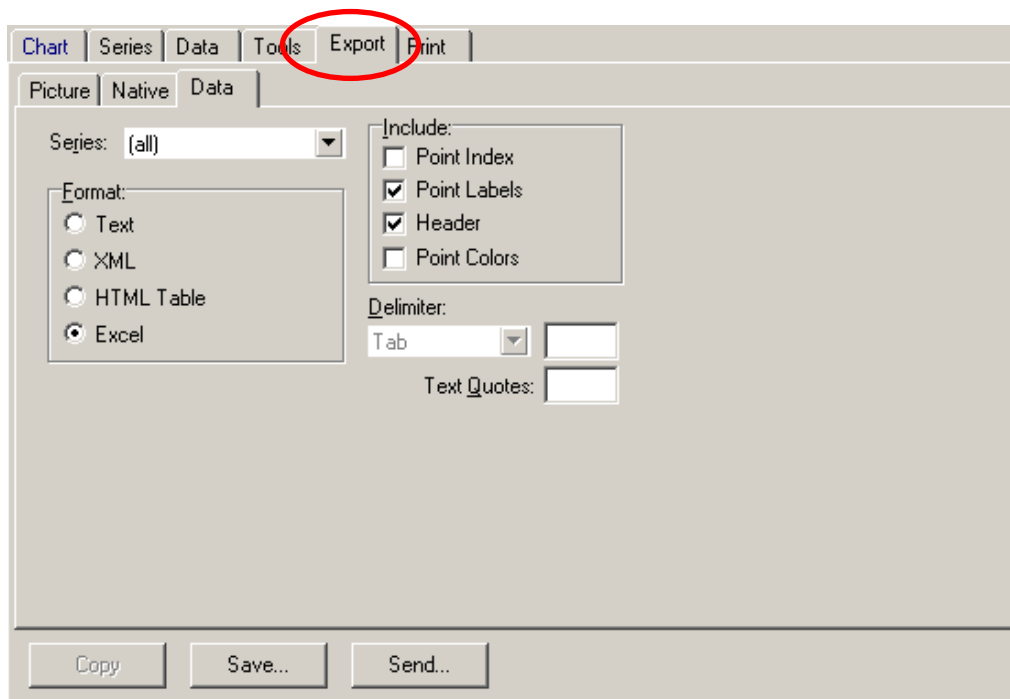


Abbildung 68: Editiermodus für Graphiken – Export (Edit – Export)

6.3 Tabellen

ToxRat erzeugt für jede Auswertung zwei Arten von Tabellen: Datentabellen, welche die auszuwertenden (Roh-)Daten enthalten, und Ergebnistabellen, die die Resultate eines statistischen Verfahrens enthalten. Die Datentabellen sind durch den Zusatz „Data“ im Namen gekennzeichnet und enthalten – je nach Workbook – entweder die Messdaten aus den Dateneingabeblättern, oder aber die von ToxRat daraus ermittelten abgeleiteten Daten, wie z.B. kumulative Anzahlen, Yields oder Wachstumsraten.



Alle Auswertungen basieren ausschließlich auf den von ToxRat intern erzeugten Datentabellen. Dies garantiert, dass ToxRat stets mit intern berechneten Summen, Mittelwerten, Standardabweichungen usw. arbeitet – unabhängig von den Zellformeln, mit denen diese Werte in den Dateneingabeblättern berechnet und ggfls. formatiert werden.

Sowohl Daten- als auch Ergebnistabellen sind unter dem Menüpunkt „Tables“ gelistet und können einzeln aufgerufen und angezeigt werden. Bei komplexen Biotests mit mehreren Variablen ist diese Liste äußerst umfangreich (Abbildung 69).

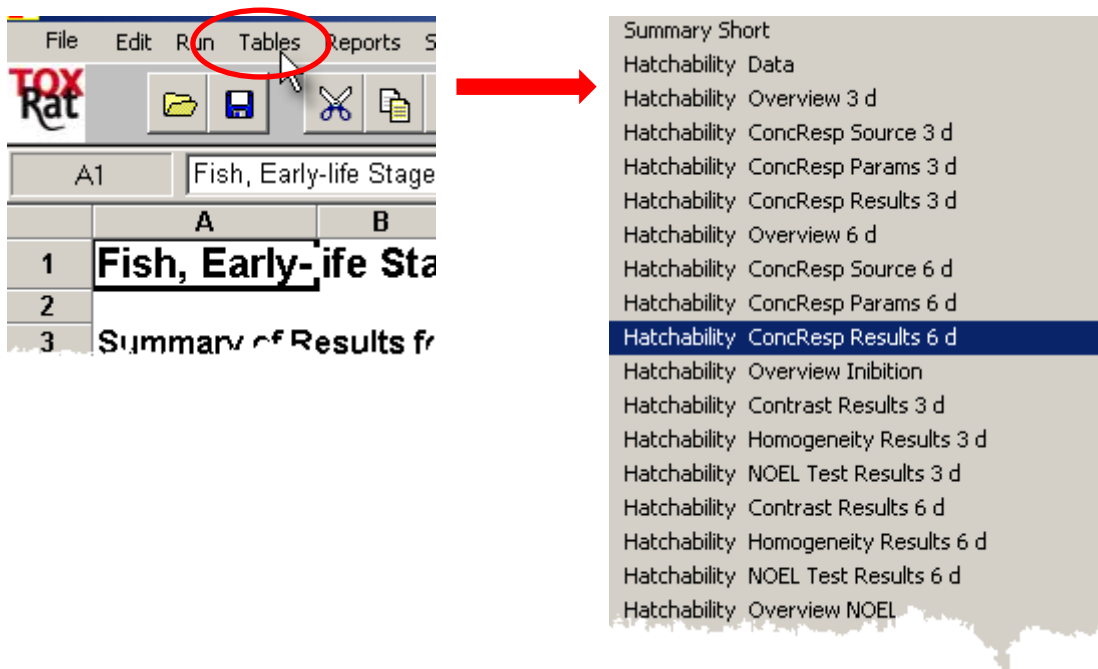


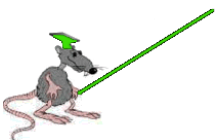
Abbildung 69: Menüpunkt Tables, enthält vollständige Liste aller in der vorliegenden Auswertung erzeugten Tabellen; jede einzeln aufrufbar

Die gute Nachricht ist: In der Regel benötigen Sie diese Liste nicht, denn alle Ergebnistabellen werden von ToxRat Variablenweise in zusätzlichen Datenblättern präsentiert, die in das Workbook eingefügt werden (gekennzeichnet mit „Tabs<Variablenname>“). (Ausnahme: Tabelle mit allen EC-Werten – vgl. Kapitel 6.5.3).

Bei einem Generic Workbook, bei dem ja nur eine Variable ausgewertet wird, gibt es nur ein Ergebnisdatenblatt. Bei einem Biotest-Workbooks gibt es mehrere, für jede Variable eins. Außerdem finden Sie dort ein Datenblatt namens „Summary“ und eins mit der Bezeichnung „Settings“ (Abbildung 70) – Näheres zu „Settings“ folgt in Kapitel 6.5.2. Ein Klick auf „refresh“ löscht alle Ergebnisdatenblätter.

33	95%-CL	lower	n.d.	3,463	2,303	1,965
34		upper	n.d.	5,904	3,770	3,088

Abbildung 70: Neu hinzugekommene Datenblätter nach einer Auswertung (hier: Workbook OECD 210)



Hinweis für Benutzer von früheren ToxRat-Versionen:
Ab der Version 3.0 finden Sie die Datentabellen nicht mehr in eigenen Tabellenblättern, sondern im Menüpunkt „Tables“. Die zusätzlichen Datenblätter sind nun den Ergebnistabellen vorbehalten, um die Dateistruktur (insbesondere bei komplexen Biotests) übersichtlicher zu machen.



Sie können die Datei mitsamt den Ergebnisdatenblättern abspeichern und jederzeit wieder in ToxRat einlesen, um die Ergebnisse zu prüfen. Beachten Sie jedoch bitte: Graphiken und Report werden nur erzeugt, wenn Sie erneut eine Auswertung durchführen!

Bei den Generic Workbooks werden die Ergebnisse in der Reihenfolge dargestellt, in der Sie die entsprechende(n) Auswertung(en) gestartet haben.

Bei den Biotest-Workbooks werden alle Ergebnisse für eine Variable (d.h. in einem Datenblatt) untereinander gelistet. Je nachdem, wie viele Messzeitpunkte für eine Variable auszuwerten sind, können die Eintragungen in einem Datenblatt mehrere hundert Zeilen umfassen. Sie müssen also scrollen, um alle Auswertungen zu sehen. Um eine bestimmte Auswertung schnell zu finden, sollten Sie wissen, dass die Darstellung in jedem Datenblatt stets einem festgelegten Ablauf folgt (vorausgesetzt, die jeweiligen ökotoxikologischen Endpunkte sind laut Guideline gefordert):

1. Dosis-Wirkungsanalyse für Messzeitpunkt 1 bis x
2. NOEC-Bestimmung für Messzeitpunkte 1 bis x
Dabei für jeden Messzeitpunkt zunächst alle Vortests, dann der Haupttest

Um Ergebnisse möglichst verständlich darzustellen, liefert ToxRat nicht nur statistische Kenngrößen, sondern erläutert diese auch, wie z.B. „p(F) is smaller than or equal to the selected significance level of 0,05; therefore, treatments are significantly different“. Bei

der NOEC -Bestimmung werden die einzelnen Schritte der Sequenzen aus Vortests und Haupttest ebenfalls erläutert, ein Beispiel finden Sie in Abbildung 71.

184	Multiple testing to find the NOEC- the SD Cochran-Armitage was performed
185	
186	To justify the use of the Step-down Cochran-Armitage test at first a trend analysis by contrasts
187	using proportions was performed.
188	

Es folgt die Ergebnistabelle der Kontrastanalyse, darunter die Schlussfolgerung:

204	The analysis of contrasts revealed a linear trend, thus the selected Step-down Cochran-Armitage
205	test was performed.
206	
207	Ahead of the Cochran-Armitage test Tarone´s test had to be performed to test for extra-binomial
208	variance.
209	

Es folgt die Ergebnistabelle des Tarone Tests, darunter die Schlussfolgerung:

228	No signs of extra-binomial variance were found (non-significant Tarone´s test) so that the
229	subsequent Cochran-Armitage was performed without adjustments.
230	

Abbildung 71: Sequenz aus erläuternden Texten und Ergebnistabellen (NOEC-Bestimmung für quantale Variable, OECD 210, Ablauf gemäß Testschema (siehe Abbildung 22, Seite 36))



ToxRat hat den Anspruch, die Vorgehensweisen bei der statistischen Auswertung und die Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen verständlich und nachvollziehbar zu machen. Nehmen Sie sich deshalb möglichst die Zeit, die Tabellenlegenden und die Texte zu den Ergebnistabellen tatsächlich zu lesen!

Dadurch und durch die Tabellenlegenden sind die Ergebnistabellen weitgehend selbsterklärend. Für einige ausgewählte Tabellen erhalten Sie im Folgenden zusätzliche Hinweise, wie Sie bestimmte Informationen nutzen können.

6.3.1 Tabelle Zusammenfassung („Summary“)

Die Zusammenfassung enthält die ökotoxikologischen Endpunkte (EC_x, NOEC, LOEC, ggfls. LID) für jede ausgewertete Variable und jeden Messzeitpunkt. Wenn Sie das jeweils verwendete statistische Verfahren in dieser Tabelle angezeigt bekommen möchten, so können Sie das im Menü Options/Report hinzuwählen (Abbildung 72). In der Voreinstellung ist diese Option nicht aktiviert.

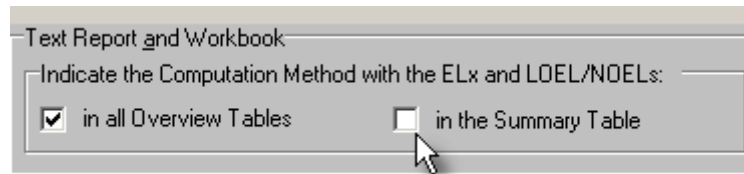


Abbildung 72: Fenster zur Auswahl, ob Methodenanzeige in Ergebnistabellen. Voreinstellung: in Übersichtstabellen ja, in Zusammenfassung nein

Unterhalb der Zusammenfassings-Tabelle finden Sie die Ergebnisse der Validitätsprüfung und die Schlußfolgerung, ob der Test als valide gewertet werden kann oder nicht.

6.3.2 Ergebnistabellen für Ausreißertests

Ausreißertests werden für jede Behandlung getrennt durchgeführt. In der Ergebnistabelle sind alle Behandlungen in Zeilen untereinander aufgelistet und für jede Behandlung gibt es zwei Spalten für die Signifikanzen: einmal wird der kleinste Wert geprüft, einmal der größte Wert. Ein Lesebeispiel (Abbildung 73): Der kleinste Wert der Kontrolle und der größte Wert der 19,2 µg/L-Behandlung sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% Ausreißer.

Outlier-test after Hampel

Outlier-test after Hampel with weight at 14,0 d: Significance level Alpha was 0,05: Med: median; MAD: median absolute deviation; n: sample size; Min, Max: minimum, maximum value of the sample; T_min, T_max: test statistic for Min, Max (after Hampel); T*: critical margin for T_min|T_max; an outlier may be assumed, in case T_min|T_max >= T* (marked by a +sign).

Treatm. [µg/L]	Med	MAD	n	Min	T_min	T*	Sign.	Max	T_max	T*	Sign.
Control	50,00	2,545	18	35,58	5,6680	4,1	+	55,00	1,9630	4,1	-
1,200	49,00	3,005	10	42,00	2,3280	4,6	-	54,00	1,6660	4,6	-
2,400	41,00	2,000	9	35,89	2,5550	4,6	-	48,50	3,7500	4,6	-
4,800	35,00	3,000	10	31,00	1,3330	4,6	-	43,00	2,6670	4,6	-
9,600	27,50	2,500	10	23,00	1,8000	4,6	-	32,00	1,8000	4,6	-
19,200	19,00	1,000	8	17,00	2,0000	4,6	-	24,00	5,0000	4,6	+

+: significant (= outlier); -: non-significant

At least one, the minimum and/or maximum value was identified as outlier(+).

Abbildung 73: Beispiel für eine Ergebnistabelle des Hampel-Ausreißertests

ToxRat entfernt grundsätzlich keine Daten aus dem Datensatz. Ausreißer können nur manuell von weiteren Auswertungen ausgeschlossen werden, indem Sie sie vor einer Auswertung in der Rohdatentabelle löschen (danach „refresh“ nicht vergessen!)

6.3.3 Ergebnistabellen für ECx Bestimmung, lineare Regression

Bei jeder linearen Regression werden vier Ergebnistabellen erzeugt:

- Übersicht über die Hemmeffekte in Prozent
- Zwischenergebnisse aus der Probit (bzw. Logit-, Weibull-) Analyse
- Parameter der Probit (bzw. Logit-, Weibull-) Analyse
- Ergebnisse: EC-Werte und Vertrauensbereiche

In der Parametertabelle finden Sie wichtige Informationen zur Beurteilung der Ergebnisse, die sogenannten **Gütekriterien**: P(Chi²) (=Maß für die Güte der Anpassung, „goodness of fit“) und P(F) (= Maß für die Signifikanz der Dosis-Wirkungsbeziehung (Abbildung 74).

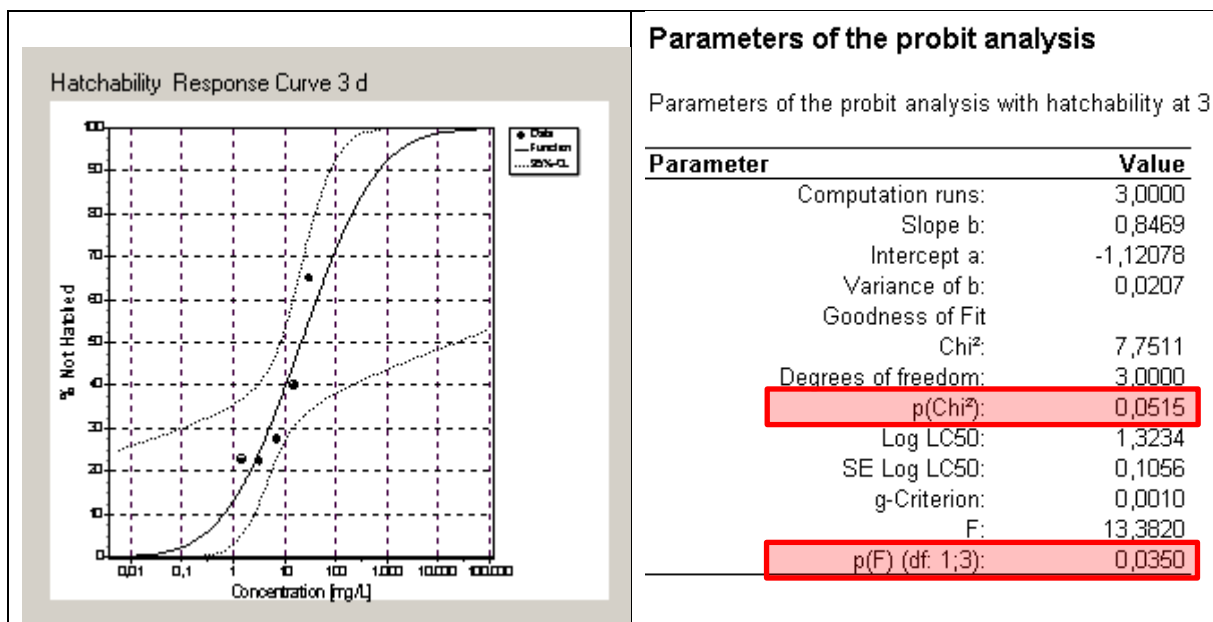


Abbildung 74: Beispiel für eine Dosis-Wirkungsanalyse für quantale Daten mittels linearer Regression; gewählte Funktion: Probit; Graphik (links) – und zugehörige Parametertabelle (rechts) mit wichtigen Gütekriterien zur Beurteilung des Ergebnisses

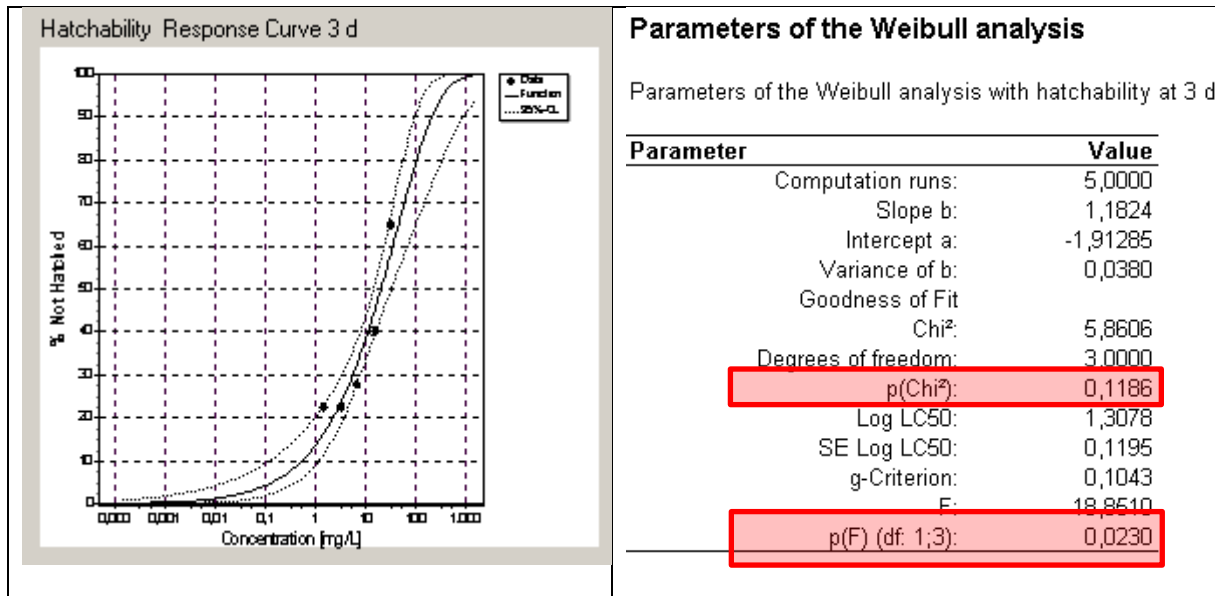


Abbildung 75: Beispiel für eine Dosis-Wirkungsanalyse für quantale Daten mittels linearer Regression; gewählte Funktion: Weibull; Graphik (links) – und zugehörige Parametertabelle (rechts) mit wichtigen Gütekriterien zur Beurteilung des Ergebnisses (gleiche Daten wie in Abbildung 74).

Der Chi²-Test prüft, wie gut der Fit die Daten beschreibt („goodness of fit“). Es ist zu erwarten, dass die Datenpunkte nicht hundertprozentig auf der Kurve liegen – die Frage ist jedoch, ob die beobachteten Abweichungen zufallsbedingt sind, oder ob die gewählte Funktion falsch ist. P(Chi²) ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Datenpunkte zufällig abweichen. Wenn p(Chi²) > 5%, dann besteht keine signifikante Abweichung zwischen Fit und Daten. Je größer p(Chi²), desto besser ist der Fit (der Maximalwert ist 1 (=100%). Wenn der Wert für p(Chi²) kleiner ist als 0,1, dann greift die sogenannte Heterogenitätskorrektur, d.h die Vertrauensbereiche werden wegen der großen Streuung der Daten vergrößert (siehe hierzu Kapitel 4.6.1, Seite 56). Bei einem guten Fit liegt p(Chi²) üblicherweise bei Werten ab 0,7 aufwärts – wird dies nicht erreicht, so sollten Sie prüfen, ob andere Funktionen (Logit, Weibull) möglicherweise besser passen (in unserem Beispiel haben wir dies in Abbildung 75 demonstriert).

Unabhängig von Güte des Fits prüft ToxRat, ob die gefundene Dosis-Wirkungsbeziehung überhaupt signifikant ist – dazu wird die gefundene Steigung einem F-Test unterzogen. Dieser prüft, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass man aus einer Grundgesamtheit ohne Dosis-Wirkungsbeziehung zufällig Messwerte erhält (= Stichproben zieht), die eine Dosis-Wirkungsbeziehung vortäuschen. Nur wenn p(F) kleiner ist als 5%, liegt eine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung vor. Wenn p(F) also größer als 5% ist, dann ist der gefundene Zusammenhang nicht signifikant, ToxRat gibt eine Warnmeldung aus (Abbildung 76) i.d.R. können keine Vertrauensbereiche berechnet werden. Je nach Datenlage ist aber trotzdem eine Ausgabe von ECx-Werten möglich. Zur Orientierung kann dies sinnvoll sein, auch wenn diese EC-Werte wegen fehlender Signifikanz und fehlenden Vertrauensbereichen nicht berichtet werden können. Wenn Sie dies nicht wünschen, können Sie es im Menü Options – Input/Output abwählen (Abbildung 77, default-Einstellung: ECx-Werte und Graphiken zeigen).

**No statistically significant concentration/response was found ($p(F) > 0.05$; i.e. slope of the relationship is not significantly different from zero).
Due to the lacking concentration/response the shown ECx appear to be not valid.**

The probability $p(F)$ is greater than 0.05; i.e. the slope was not significantly different from zero. The effect parameters and confidence limits could be meaningless.

Abbildung 76: Warnmeldung, wenn Fit nicht signifikant

Exposure Type and Toxicity Parameter
Select appropriate abbreviation; the first two letters are used together with concentrations/doses/rates, etc.

Concentration

Show ECx values and graphs also in case of non-significant dose/resp. relation

Add Chronic Value (ChV) to NOEL results

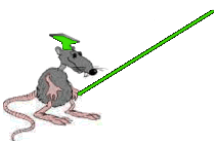
Abbildung 77: Einstellmöglichkeit, ob Ausgabe von ECx und Graphiken auch im Fall von nicht signifikanten Dosis-Wirkungs-Beziehungen (Menü Options- Input/Output).

Bei manchen Datenlagen scheint es auf den ersten Blick verwunderlich, dass keine Vertrauensbereiche gezeigt werden, da scheinbar eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung vorhanden und die Güte des Fits sehr gut ist (Abbildung 78).

Ein Blick auf $p(F)$ zeigt jedoch: die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die drei Datenpunkte rein zufällig so liegen (d.h. nicht Effekt-bedingt), beträgt 12,3% - die gefundene Beziehung ist deshalb nicht signifikant, es können keine Vertrauensbereiche berechnet werden.

Was können Sie in so einem Fall tun?

Die Datenbasis kann erhöht werden. Eine Möglichkeit dazu sind zusätzliche Behandlungen – dies bedeutet jedoch in den meisten Fällen eine Wiederholung des Versuchs. Falls Replikate vorliegen, geht es auch mit den vorhandenen Daten: schalten Sie die Option „Use Replicates while Fitting“ ein (vgl. Kapitel 4.6.1 Lineare Regression). Dadurch wird die gefundene Beziehung signifikant (Abbildung 79). Diese Option ist jedoch nur für metrische Daten verfügbar.



Das Mittel, um signifikante Dosis-Wirkungsbeziehungen mit möglichst engen Vertrauensbereichen zu erhalten, lautet: umfangreiche Datenbasis! Das heißt: möglichst viele Konzentrationen untersuchen, alternativ: auf Basis der Replikate fitten. Der geprüfte Konzentrationsbereich sollte einen möglichst breite Spannweite an Hemmungen abdecken, da nicht aus dem Datenbereich heraus extrapoliert werden soll.



Die Parametertabelle enthält zwei wichtige Maße zur Beurteilung der erhaltenen Dosis-Wirkungsbeziehung:
 P(Chi²) (=Maß für die Güte der Anpassung, „goodness of fit“) und
 P(F) (= Maß für die Signifikanz der Dosis-Wirkungsbeziehung)
 Weitere Erläuterungen hierzu finden Sie im Text.

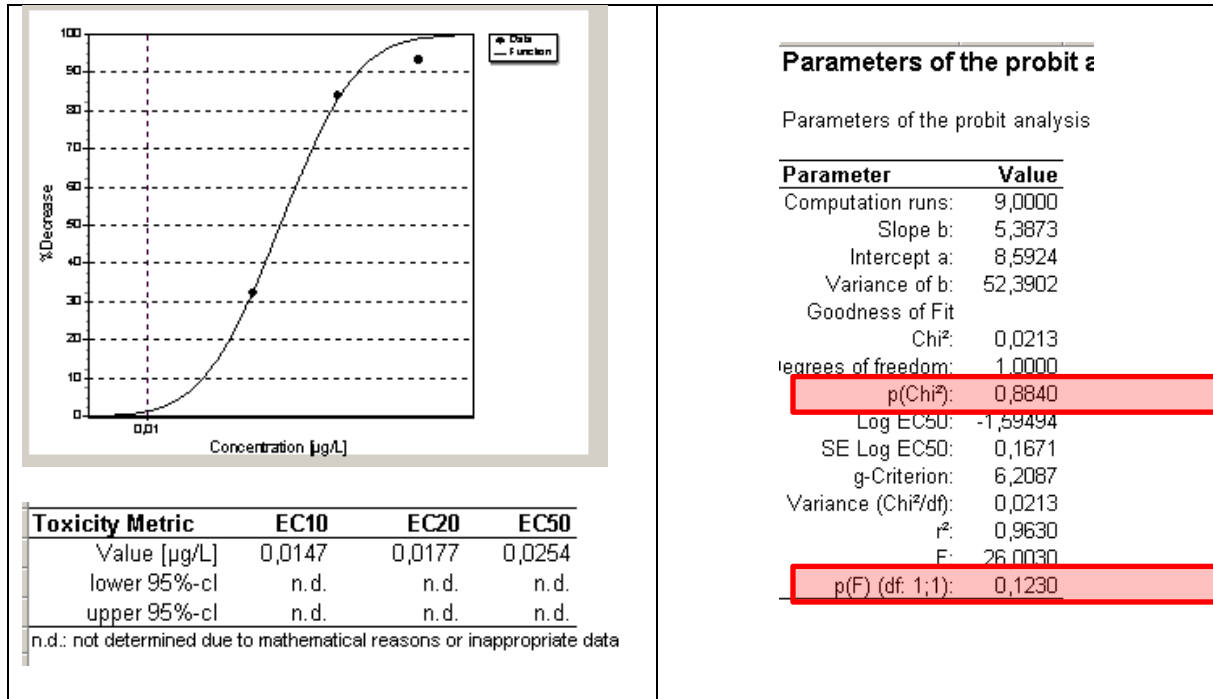


Abbildung 78: Beispiel für nicht signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung

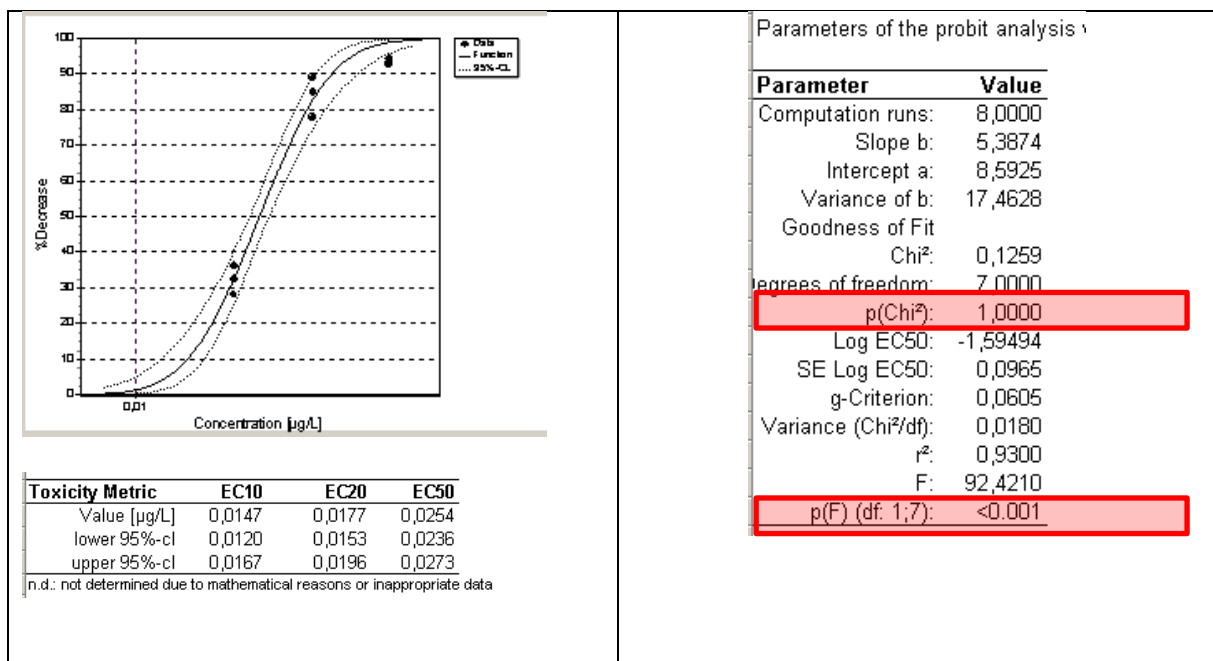


Abbildung 79: Beispiel für signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung, erzielt durch Fit auf Baiss der Replikate. Daten aus Abbildung 78.

6.3.4 Ergebnistabellen für ECx Bestimmung, nicht-lineare Regression

Bei jeder nicht-linearen Regression werden folgende Ergebnisausschriebe bzw. -tabellen erzeugt:

- Übersicht über die Hemmeffekte in Prozent
- Text: entweder Beschreibung, welche Regression durchgeführt wurde oder Information, dass Regression erfolglos (dann entfallen die folgenden Tabellen);
- Parametertabelle, einschließlich Signifikanzen (nur möglich bei Levenberg-Marquardt Algorithmus) und Gütekriterien
- Varianzanalyse (Prüfung der Regression auf Signifikanz) und Test auf „Lack of fit“
- Messwerte, Erwartungswerte und Gewichtungsfaktoren
- Ergebnisse: EC-Werte und Vertrauensbereiche

Wenn die Regression erfolgreich war, erstellt ToxRat eine Beschreibung der angewendeten Einstellungen (

Abbildung 80, oben), gefolgt von den oben genannten Ergebnistabellen. Achtung: „Erfolgreich“ bedeutet lediglich, dass alle Schritte der Regression formal erfolgreich durchlaufen werden konnten, d.h. dass für die ermittelten Funktionsparameter Konvergenz erreicht wurde⁴. Wurde keine Konvergenz erzielt, so erfolgt ein entsprechender Ausschrieb (

Abbildung 80, unten). **Wichtig:** „Konvergenz“ ist kein Muss. Besteht eine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung und sind die Ergebnisse der Regression plausibel, können die Resultate verwendet werden, auch wenn keine Konvergenz erzielt wurde.

Umgekehrt bedeutet Konvergenz *nicht* notwendigerweise, dass das erhaltene Ergebnis signifikant und die Fitqualität gut ist! Um dies zu beurteilen, müssen Sie die Parametertabelle und die übrigen Gütekriterien heranziehen (siehe unten).

Fehlende Konvergenz kann verschiedene Ursachen haben („stop reasons“), diese werden von ToxRat spezifiziert. Falls die Ursache darin liegt, dass die Anzahl der Iterationen nicht ausreichend war („Stop reason = Iterations > Max. Iterations“), können Sie versuchen, die Anzahl der Optimierungsschritte zu erhöhen (Fenster „Further Options“, Kasten „Optimization“, siehe Abschnitt 4.6.2). Vielversprechender dürfte aber die Änderung der Gewichtung sein oder die Auswahl einer anderen Funktion.

```
The 3-param. normal CDF  $F(x) = b_0 * [\text{NormalCDF}(b_1 - \log_{10}(x)/b_2 + z_{\text{Opt}})]$  was fitted to the data (CDF: cumulative distribution function;  $b_0$ - $b_2$ : parameters;  $z_{\text{Opt}}$ : adjustment to have the EC10 as parameter  $b_1$ ;  $x$ : concentration).  
An iteratively re-weighted non-linear regression with relative weighting ( $1/Y^2$ ) was performed.  
The optimization converged thus fitting was successful (Stop Reason = Converged (Optimization method: Levenberg-Marquardt)).
```

PLEASE NOTE: The non-linear regression procedure was terminated without achieving convergence due to mathematical problems (Stop Reason = Iterations > Max. Iterations (Optimization method: Levenberg-Marquardt)).

Please try whether an increase in the number of optimization cycles lead to convergence, or try modified settings, another function or another optimization method to get acceptable results.

Abbildung 80: Beispielausschriebe wenn Regression erfolgreich (oben) und wenn erfolglos abgebrochen (unten)

⁴ Vereinfachte Erläuterung: Die abgeleitete Funktion wird solange optimiert, bis die dadurch erzielte Änderung der gefundenen Parameter einen bestimmten Grenzwert erreicht – d.h. bis die Genauigkeit gegen diesen Grenzwert „konvergiert“.

Im Folgenden geben wir Ihnen eine Übersicht über die verschiedenen Gütekriterien, geordnet nach Relevanz. Im Anschluss daran werden die verschiedenen Ergebnistabellen vorgestellt und erläutert, wo Sie die Gütekriterien finden.

Gütekriterien für die nicht lineare Regression, geordnet nach Wichtigkeit

Varianzanalyse F-Test	Prüft, ob die gefundene Dosis-Wirkungs-Beziehung signifikant ist	Ziel: Signifikanz ($p(F) < 0,05$); zwingend nötig , sonst EC-Werte ohne Relevanz und keine Vertrauensbereiche; je kleiner $p(F)$, desto besser ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung
Lack of Fit, F-Test	Prüft, ob Abweichungen zwischen Messwerten und Funktion zufallsbedingt sind	Ziel: keine Signifikanz ($p(F) > 0,05$) (denn dann kein „Lack of Fit“) kein Muss, aber Soll ; je größer $p(F)$, desto besser ist der Fit; Maximum = 1.
Funktionsparameter, t-Test	Prüft, ob Funktionsparameter signifikant	Ziel: Signifikanz ($p(t) < 0,05$); empfehlenswert ; wenn einer der Parameter nicht signifikant, dann Funktion mit weniger Parametern ausprobieren
R^2 Bestimmtheitsmaß	Gibt an, welcher Anteil der Varianz der Daten von der gefundenen Funktion erklärt wird	Ziel: möglichst großes R^2 wünschenswert , wichtig: R^2 ist nicht so eindeutig zu interpretieren wie bei der linearen Regression; deshalb nicht geeignet, um den bestmöglichen Fit auszuwählen
Akaike-Kriterium	Relatives Maß für die Fitqualität, basiert u.a. auf Restvarianz und Anzahl Parametern	Entscheidungshilfe ; wenn übrige Bedingungen (siehe oben) erfüllt, dann diejenige Funktion für einen bestimmten Datensatz wählen, die den kleinsten AIC-Wert ergibt.

Die **Parametertabelle** (Abbildung 81) enthält die Ergebnisse für die Funktionsparameter. Im Fall des Levenberg-Marquardt Algorithmus werden auch ihre Standardfehler und Vertrauensbereiche sowie die jeweilige **Signifikanz** im t-Test gelistet. Sind nicht alle Parameter signifikant, so wurde möglicherweise eine Funktion mit zu vielen Parametern gewählt – probieren Sie in dem Fall eine Funktion mit weniger Parametern aus. Handelt es sich um eine Normal-CDF, so entspricht einer der Parameter dem Logarithmus eines EC-Wertes – Näheres finden Sie in der Tabellenlegende.

Der Wert für das **Bestimmtheitsmaß** (engl: coefficient of determination), R^2 , gibt an, welcher Anteil der Varianz der Daten von der ermittelten Funktion erklärt wird. Jedoch ist dies bei der nicht linearen Regression nicht so eindeutig interpretierbar wie bei der linearen Regression und sollte deshalb unter Vorbehalt betrachtet werden.

Die Rest-Standardabweichung = Wurzel aus Restvarianz (**Residual Standard Error**) hängt von der Streuung der Daten ab und hat dieselbe Dimension wie die Daten, d.h. sie ist relativ zu den Messwerten zu sehen. Anhand dieses Wertes können Sie zwei unterschiedliche Regressionen für denselben Datensatz miteinander vergleichen – je kleiner die Restvarianz, desto besser.

Auch das **Akaike-Kriterium** (AIC) ist ein relatives Maß für die Fitqualität, sein Wert wird berechnet aus Restvarianz, Anzahl Parametern und Anzahl der Wertepaare im Datensatz. Mit Hilfe des AIC können Sie die Ergebnisse verschiedener nicht-linearer Regressionen mit unterschiedlichen Einstellungen für ein und denselben Datensatz miteinander vergleichen: je kleiner der AIC-Wert, desto besser der Fit.

Der **Shapiro-Wilks-Test** prüft, ob die Residuen (d.h. die Abweichungen der beobachteten Werte von den Funktionswerten) normalverteilt sind. Ist dies nicht der Fall (d.h. ist $p(W) < \alpha$, empfohlener Wert für $\alpha = 0,01$), weicht die gefundene Funktion möglicherweise systematisch von den beobachteten Daten ab. Dies ist insbesondere beim Bootstrapping-Verfahren von Bedeutung, da dabei Normalverteilung der Residuen vorausgesetzt wird. Dieses Kriterium dient nur zur Information, dass die gefundene Funktion möglicherweise nicht ganz optimal ist – wenn ansonsten alle übrigen Gütekriterien sinnvolle Ergebnisse liefern, ist ein signifikanter Shapiro-Wilks-Test tolerabel.

Estimated parameters of the 3-param. normal CDF

Estimated parameters of the 3-param. normal CDF: Results of the non-linear regression analysis; b0 - b2: parameters; Std. Err.: standard error; 95%LCL|UCL: 95%-lower|upper confidence limits; t: t-statistic (Ho: $b_0|b_1|b_2 = 0$); p(t): probability that the deviation from zero is due to chance ($b_1 = \log EC_{10}$)

Parameter	Value	Std. Err.	95%LCL	95%UCL	t	p(t)
b0	50.575	1.011	48.555	52.596	50.035	<0.001
b1	0.185	0.071	0.044	0.326	2.622	0.005
b2	0.692	0.045	0.603	0.782	15.433	<0.001

Stop Reason = Converged (Optimization method: Levenberg-Marquardt)

R²: 0.955; adjusted R²: 0.953

Residual standard error: 0.40670

Akaike Criterion (AIC): 245.865

Shapiro Wilk's test on normal distribution of residuals: p = 0.022.

Abbildung 81: Ergebnisse der nicht-linearen Regression: erhaltene Fitparameter und Gütekriterien. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Eine wesentliche Aussage über die Güte des Fits machen die Varianzanalyse und der Test auf „Lack of Fit“ (Abbildung 82).

Mittels der **Varianzanalyse** wird geprüft, ob die erhaltene Funktion einen signifikanten Anteil der Varianz erklärt. Sollte dies nicht der Fall sein (d.h. sollte $p(F) > 0,05$ sein), ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht signifikant – die erhaltenen EC-Werte somit ohne Relevanz. Der **F-Test** prüft, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass man aus einer Grundgesamtheit ohne Dosis-Wirkungsbeziehung zufällig Messwerte erhält (= Stichproben zieht), die eine Dosis-Wirkungsbeziehung vortäuschen. Nur wenn $p(F)$ kleiner ist als 5%, liegt eine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung vor. Wenn $p(F)$ also größer als 5% ist, dann

ist der gefundene Zusammenhang nicht signifikant. ToxRat gibt in diesem Fall eine entsprechende Warnmeldung aus und es werden keine Vertrauensbereiche gezeigt. Der Test auf „Lack of Fit“ prüft, wie gut die Funktion die Daten beschreibt. Es ist zu erwarten, dass die Datenpunkte nicht hundertprozentig auf der Kurve liegen – die Frage ist jedoch, ob die beobachteten Abweichungen zufallsbedingt sind, oder ob die gewählte Funktion falsch ist. $P(F)$ für Lack of Fit ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Datenpunkte zufällig abweichen. Wenn $p(F) > 5\%$, dann besteht keine signifikante Abweichung zwischen Fit und Daten. Je größer $p(F)$, desto besser ist der Fit, der Maximalwert ist 1 (=100%). Wenn Sie verschiedene Regressionsergebnisse für denselben Datensatz miteinander vergleichen, so gilt: je größer $p(F)$ für Lack of Fit, desto besser beschreibt die betreffende Funktion die Daten.

Analysis of Variance and Test for Lack of Fit for the 3-param. normal CDF

Analysis of Variance and Test for Lack of Fit for the 3-param. normal CDF: Source: source of variance; SS: sum of squares; df: degrees of freedom; MSS: mean sum of squares; F: test statistic; $p(F)$: probability that the variance explained by the regression is due to chance; Pure error: residual SS|MSS of an one-way ANOVA with the original data (CDF: cumulative distribution function)

Source	SS	df	MSS	F	$p(F)$
Regression	198,82	2	99,41	601,011	<0.001
Residuals	10,26	62	0,17		
- Lack of Fit	0,43	3	0,14	0,855	0,470
- Pure Error	9,83	59	0,17		
Total	208,25	64			

Since $p(F|Regression) \leq 0.05$, a significant amount of variance is explained by the regression model.

Since $p(F|Lack of Fit) > 0.05$, there is no significant lack of fit.

Abbildung 82: Ergebnisse der nicht-linearen Regression: Varianzanalyse und Lack of Fit.

Die nächste Ergebnistabelle (Abbildung 83) vergleicht die Messwerte und die Erwartungswerte. Wurde eine gewichtete Regression durchgeführt, finden Sie hier außerdem die im letzten Iterationsschritt verwendeten Gewichtungsfaktoren.

Abschließend erfolgt die Ausgabe der berechneten EC-Werte und ihrer Vertrauensbereiche (Abbildung 84).

Die graphische Darstellung basiert auf den Originalmesswerten (Abbildung 85).

Observed and Predicted Results of the 3-param. normal CDF

Observed values in weight after 14,0 d as caused by the test item and predicted values as calculated from the function; Weight: weighting factors used in the final iteration step.

Treatm.[µg/L]	Observed	Mean Obs.	Predicted	Weight
0,010	50,000	50,0994	50,5755	0,0067
0,010	49,000	50,0994	50,5755	0,0067
0,010	52,100	50,0994	50,5755	0,0067
0,010	48,700	50,0994	50,5755	0,0067
0,010	53,000	50,0994	50,5755	0,0067
1,200	45,000	48,5170	46,7445	0,0078
1,200	48,000	48,5170	46,7445	0,0078

Abbildung 83: Ergebnisse der nicht-linearen Regression: Erwartungswerte und Gewichtungsfaktoren

Point estimates from the 3-param. normal CDF

Point estimates from the 3-param. normal CDF: Selected effective concentrations (EC_x) of the test item; cl: confidence limit

Toxicity Metric	EC10	EC20	EC50
Value [µg/L]	1,531	3,086	11,807
lower 95%-cl	1,106	2,237	7,946
upper 95%-cl	2,118	4,262	17,399

n.d.: not determined due to mathematical reasons

The confidence limits of the EC10 used as a parameter were computed by means of the standard error of parameter b1; confidence limits for the remaining EC_x were estimated by Monte-Carlo simulation

Abbildung 84: Ergebnisse der nicht-linearen Regression: EC_x-Werte und Vertrauensbereiche

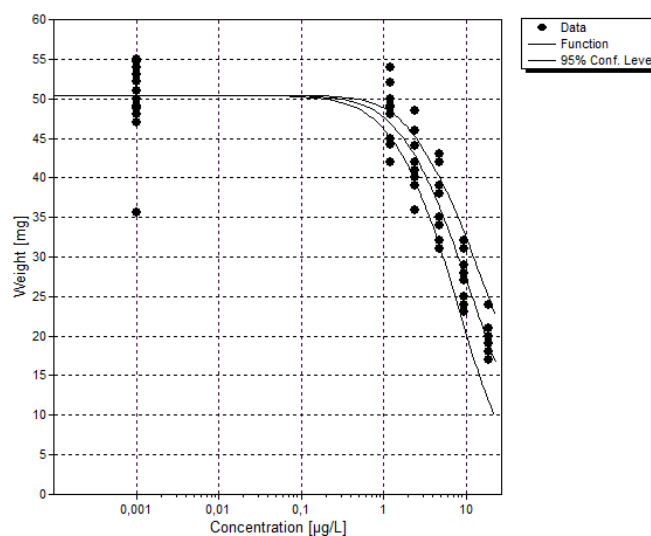


Abbildung 85: Ergebnisse der nicht-linearen Regression, graphische Darstellung; Aufgetragen werden die Originalmesswerte

6.3.5 Ergebnistabellen für parametrische Tests – MDD als Maß für Teststärke

Bei allen parametrischen Tests (t-Test, Dunnett, Williams) bestimmt ToxRat die kleinste nachweisbare Differenz (MDD, minimum detectable difference,) (Abbildung 86). Die MDD gibt an, wie groß ein Effekt (also die prozentuale Differenz zwischen Wert der Kontrolle und Wert der Behandlung) mindestens sein muss, um mit dem vorliegenden Test als statistisch signifikant erkannt werden zu können.

Die MDD ist somit ein Maß für die Teststärke – je kleiner die MDD, desto stärker ist der Test. Je größer der Stichprobenumfang und je kleiner die Varianz, desto kleiner die MDD. Außerdem zeigt ein und derselbe Datensatz je nach statistischem Test unterschiedlich große MDDs (vgl. Abbildung 21).



Die MDD ist eine Art „Nachweisgrenze“ für statistische Tests. Mit ihrer Hilfe können Sie einordnen, wie aussagekräftig ein Testergebnisses von „signifikant“ oder „nicht signifikant“ ist. Sie sollten der Spalte MDD in den entsprechenden Tabellen deshalb stets besondere Aufmerksamkeit widmen.

STUDENT-t test for Homogeneous Variances with Bonferroni-Holm Adjustment'

STUDENT-t test for homogeneous variances with Bonferroni-Holm adjustment with weight at 14,0
d: Multiple sequentially rejective comparisons of treatments with "Control". Significance was
Alpha = 0,05, one-sided smaller; Mean: arithmetic mean; n: sample size; s: standard deviation;
MDD: minimum detectable difference to Control (in percent of Control); t: sample t; p(t): probability
of sample t for Ho: $\mu_1 = \mu_2$; Alpha(i): adjusted significance levels; the differences are significant in
case $p(t) \leq \text{Alpha}(i)$ (The residual variance of an ANOVA was applied; $df = N - k$; N: sum of treatment replicates
 $n(i)$; k: number of treatments).

Treatm. [$\mu\text{g/L}$]	Mean	s	df	%MDD	t	p(t)	Sign.	Sign.
Control	50,10	3,850						
1,200	48,52	3,850	59	-5,06	-1,04	0,151	0,050	-
2,400	41,82	3,850	59	-6,28	-5,27	< 0,001	0,025	+
4,800	36,30	3,850	59	-6,6	-9,09	< 0,001	0,017	+
9,600	27,30	3,850	59	-6,97	-15,02	< 0,001	0,013	+
19,200	19,50	3,850	59	-7,81	-18,7	< 0,001	0,010	+

+ : significant; - : non-significant

A NOEC of 1,200 $\mu\text{g/L}$ is suggested by the program.

Abbildung 86: Ergebnistabelle für parametrischen Test mit Angabe der MDD als Maß für die Teststärke (hier: 5,06% - 7,81%, es handelt sich somit um einen sehr starken Test).

6.4 Formatierung

6.4.1 Dezimaltrennzeichen

Die Art des verwendeten Dezimaltrennzeichens (Komma / Punkt) können Sie nicht in ToxRat einstellen, denn ToxRat übernimmt dazu die aktuellen Systemeinstellungen des Betriebssystems (WIN XP: Systemsteuerung / Regions- und Sprachoptionen; WIN7: Systemsteuerung / Zeit, Sprache und Region). Sollten Sie also in den ToxRat Tabellen oder Reports andere Dezimaltrennzeichen benötigen, als normalerweise auf Ihrem Computer eingestellt, so müssen Sie dies vor Aufruf von ToxRat in den Systemeinstellungen ändern.

6.4.2 Anzahl Nachkommastellen

Je nachdem, um welche Werte es sich handelt (Testkonzentrationen, Hemmwerte, Kenngrößen wie Mittelwerte, Endpunkte wie ECx und NOEC...), finden Sie die entsprechenden Formatierungseinstellungen an den folgenden Stellen im Programm:

Generic Workbooks

Sheet General Notes

Abbildung 87

Zeile 21 (Decimals data)

Anzahl Nachkommastellen n für statistische **Basiskenngrößen** wie Mittelwert, Standardabweichung (Anzahl Stellen = n+1), Medianwert, Minimum, Maximum usw.

Zeile 22
(Decimals concentrations)

Anzahl Nachkommastellen für a) **ECx und NOEC-Werte** und b) die in den InputRawData sheets eingegebenen **Test-Konzentrationen**.

Zu b): führt zu einer einheitlichen Anzahl Nachkommastellen für Testkonzentrationen in den Daten- und Ergebnistabellen, ggfls. wird mit Nullen „aufgefüllt“. Wichtig: damit der hier eingestellte Wert wirksam wird, muss in Options/Input-Out angeklickt sein „use formatted values“ (Abbildung 88, ist per default gewählt).

Zeile 23
(Decimals time periods)

Anzahl Nachkommastellen für den / die **Messzeitpunkt(e)**.

Menü Options / Input-Output

Abbildung 88

Testkonzentrationen

Wenn die **Testkonzentrationen** so dargestellt werden sollen, wie im Dateneingabeblatt eingegeben (d.h. ggfls. mit unterschiedlichen Anzahlen Nachkommastellen), dann entfernen Sie das Häkchen bei „use formatted values“.

Prozentwerte

Anzahl Nachkommastellen für **Prozentwerte**, z.B. % Hemmung, % MDD, % Mortality

Wahrscheinlichkeiten

Anzahl Nachkommastellen für **statistische Wahrscheinlichkeiten**, p(Testgröße).

	A	B
1	Statistical Evaluation of a Metric Response	
2	General:	(Fill in: grey = optional; green = obligatory; yellow = added by program; red = don't change!)
3	Test Identification/Project No.	Algae Test Data
4	Test Material	aSubstance
5	Unit of Test Material Concentration	µg/L
6	Start of Experiment on Day	
7	Date and Time of the Evaluation	28.03.2014;
8		
9	(User area; you may add further items)	
10		
11		
12		
13	Te	
14	NU	
15	Du	
16		
17	Measurement Variable	Cellcount
18	Test System	Soened... as subspicatus
19		NOEC/...
20	Statistics:	
21	# Decimals Data	3
22	# Decimals concentrations	3
23	# Decimals for Time Periods	0

Abbildung 87: Formatierungseinstellungen für Generic Workbooks, Blatt „Generic Notes“; für Biotest-Workbooks entfällt Zeile 21, siehe statt dessen Abbildung 88.

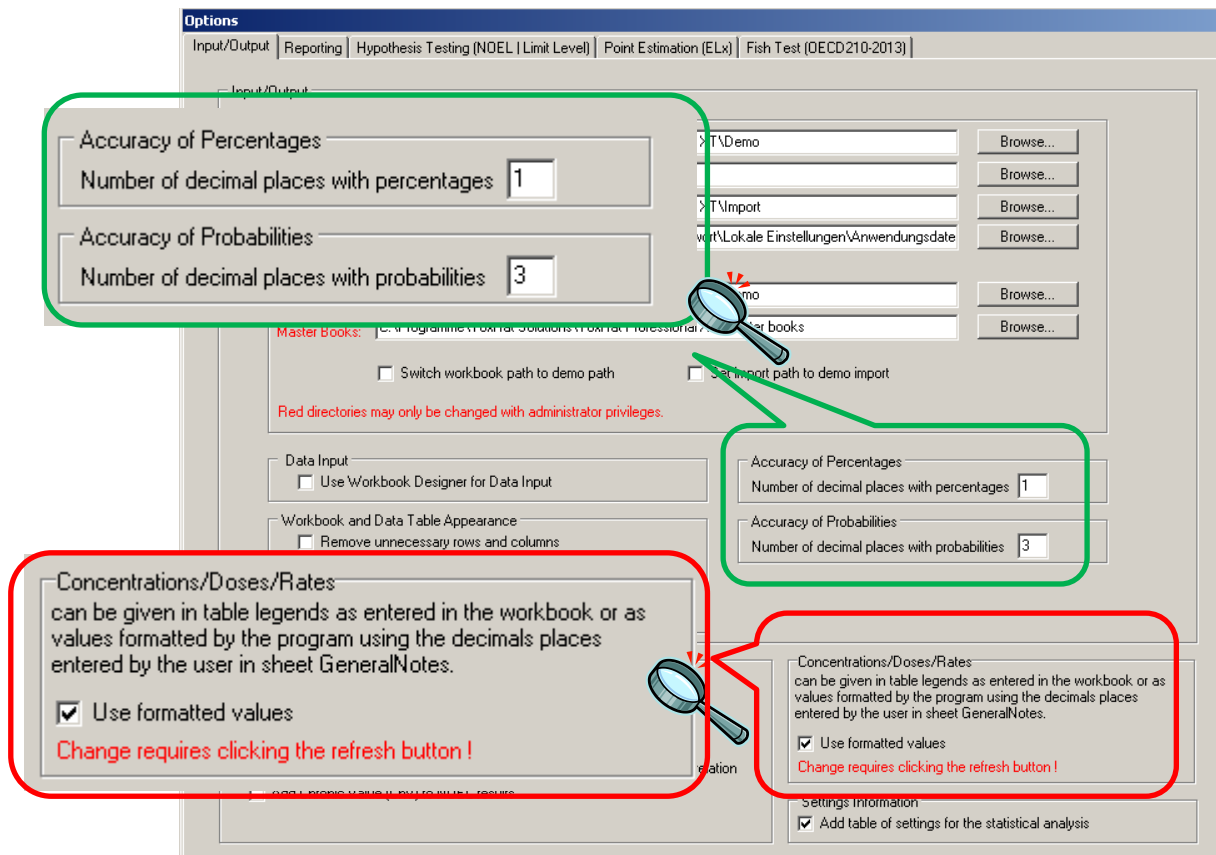


Abbildung 88: Formatierungseinstellungen im Fenster Options / Input-Output

Biotest-Workbooks

Bei einem Biotest-Workbook sind die Regeln für Formatierungseinstellungen grundsätzlich dieselben wie bei einem Generic Workbook (siehe oben, Abbildung 87 und Abbildung 88) – mit einer Ausnahme:

Da es nicht nur eine, sondern mehrere Variablen geben kann, wird die Anzahl der Nachkommastellen für die **statistischen Kenngrößen** wie Mittelwert, Standardabweichung, Medianwert, Minimum, Maximum usw. nicht in Zeile 21 des Blattes „General Notes“ festgelegt, sondern kann für jede Variable individuell eingestellt werden im Fenster Options-NOEC, unterhalb des grünen Kastens für die Variablenauswahl („Decimals of current variables in tables“) (Abbildung 89).

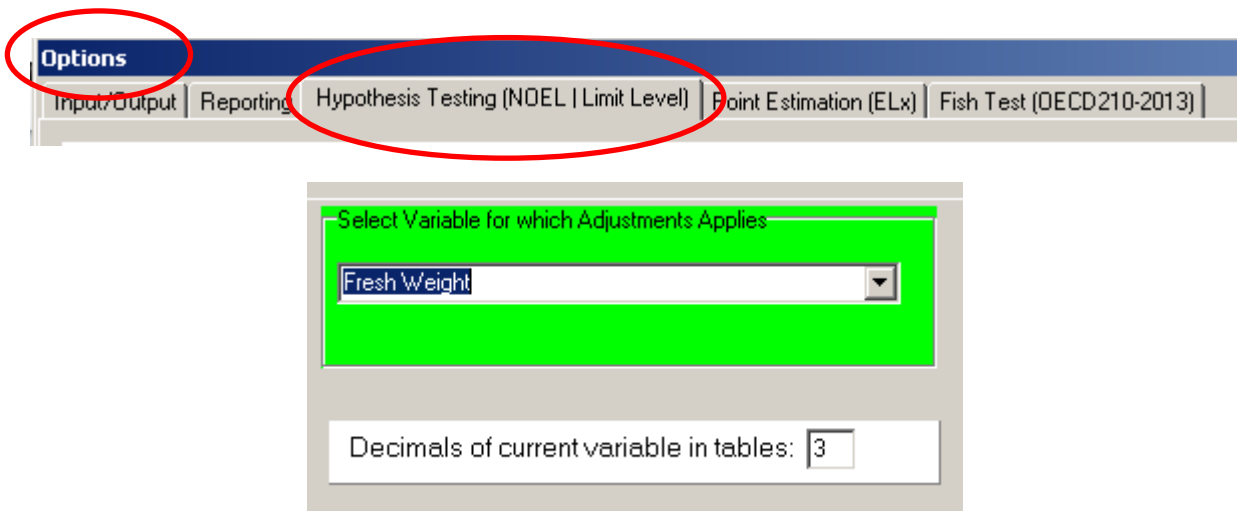


Abbildung 89: Variablenspezifische Einstellung der Nachkommastellen für statistische Kenngrößen (Mittelwert, Standardabweichung, Medianwert, Minimum, Maximum usw.) bei Biotestworkbooks.

Nachkommastellen für Parameter der nicht-linearen Regression

Die Nachkommastellen für die Parameter, die bei der nicht-linearen Regression ermittelt werden, werden in allen Workbooks im Menü „Nicht lineare Regression“ festgelegt (Find Effect Level - „Non Linear Regression – Further Options“, Kasten „Presentation“, siehe Abbildung 36).



Unabhängig von der aus Darstellungsgründen gewählten Anzahl Nachkommastellen in Tabellen gilt: ToxRat rechnet stets mit allen berechneten Nachkommastellen! Dies kann dazu führen, dass leicht unterschiedliche Ergebnisse herauskommen, wenn Sie bestimmte Auswertungen „zu Fuß“ nachrechnen und dabei gerundete Zahlenwerte aus den Datentabellen verwenden.

6.5 Optionale Einstellungen

Oder: Welche Einstellungen benötigen Sie?

In diesem Abschnitt stellen wir Ihnen verschiedene optionale Einstellungen für die Ergebnisdarstellung von ToxRat vor.

6.5.1 Chronic Value (ChV)

In manchen US-Amerikanischen Richtlinien (EPA/OPPT, Environmental Protection Agency / Office of Pollution Prevention and Toxics) wird neben dem NOEC und dem ELx der sog. Chronic Value (ChV) als zusätzlicher Toxizitätsparameter verlangt. Der ChV ist definiert als geometrisches Mittel von “no observed effect concentration” (NOEC) und “lowest observed effect concentration” (LOEC) und wird berechnet als $ChV = 10^{([\log (LOEC \times NOEC)]/2)}$.

Wenn Sie im Menu Options – Input/Output ein Häkchen setzen bei „Add Chronic Value (ChV) to NOEL results“ (Abbildung 90, linke Seite), dann gibt ToxRat diesen Parameter zusätzlich aus. Diese Option ist per default ausgeschaltet.

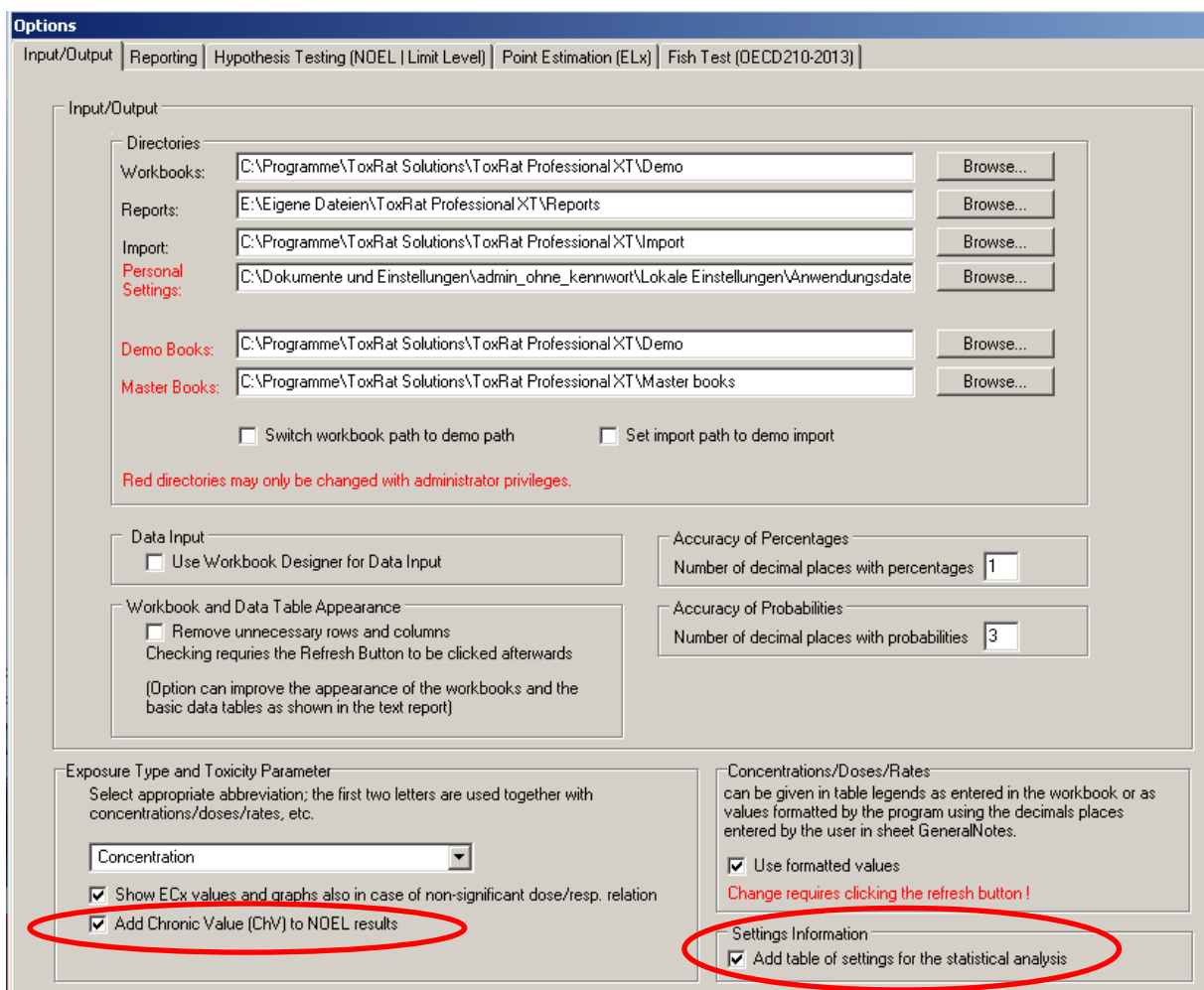


Abbildung 90: Einstellmöglichkeit für die Ausgabe des Chronic Value (links) und zusätzlicher settings-Tabelle (rechts)

6.5.2 Settings

Um auch solche Auswertungen schnell reproduzieren zu können, die nicht mit den programmseitigen Voreinstellungen, sondern mit individuellen Einstellungen durchgeführt wurden, erzeugt ToxRat eine sogenannte settings-Tabelle. Darin sind alle für die aktuelle Auswertung verwendeten Einstellungen dokumentiert, und es ist dargestellt, ob diese von den programmseitigen Voreinstellungen abweichen (Abbildung 91). Die settings-Tabelle wird per default als letzte Ergebnistabelle (hinter „Summary“) gezeigt. Wenn Sie die Settings-tabelle nicht benötigen, entfernen Sie im Menu Options – Input/Output das Häkchen bei „Add Table of Settings for the Statistical Analysis“ (Abbildung 90, rechte Seite). Sie wird auch im den Report gelistet, es sei denn, das entsprechende Element wird im Report-Menü abgewählt (vgl. Kapitel 7).

Fish, Early-life Stage Toxicity Test (OECD 210-2013): aProject			
Settings Table			
Area	Item	Default Settings	User Settings
Global	Type of Exposure		Concentration
	Extrapolation of ECx	By program	By program
	Show non-significant ECx	YES	YES
	Statistical design	NOEC/ECx	NOEC/ECx
Variables			
Hatchability	State	Selected for analysis	Selected for analysis
	Data transformation	none	none
	Decimals data	1	1
	Final testing		
	Test procedure	SD Cochran-Armitage	Bonferroni Fisher
	Who selected final test	Program	User
	Additional tests	None	None
	Significance level	0,05	0,05
	Test direction	one-sided greater	one-sided greater
	LCx computation		
	Selected LCx values	LC10, LC20, LC50	LC20, LC30, LC50, LC90
	Selected method	Linear Regression	Linear Regression
	Regress. type	Max. Likelihood	Max. Likelihood
	Dose/response function	Probit (normal sigmoid)	Probit (normal sigmoid)
	Sig. level goodness of fit	0,10	0,10
	Data	Treatment mean/total	Treatment totals
	Confidence limits	after Fieller	after Fieller
	Control mortality	Not compensated	Compensated after Abbott
Post-hatch survival	State	Selected for analysis	Selected for analysis
	Data transformation	none	none
	Decimals data	0	0
	Final testing		
	Test procedure	SD Cochran-Armitage	SD Cochran-Armitage

Abbildung 91: Settings-Tabelle (Ausschnitt), bietet Übersicht über die für eine Auswertung gewählten Einstellungen (Beispiel: Workbook OECD 210)

6.5.3 Ausgabe nicht signifikanter und / oder aller EC-Werte

Je nach Datenlage kann es vorkommen, dass zwar rein formal EC-Werte berechnet werden können, die gefundene Dosis-Wirkungs-Beziehung jedoch nicht signifikant ist (vgl Kapitel 6.3.3). Standardmäßig gibt ToxRat in so einem Fall eine Warnmeldung aus und berechnet keine Vertrauensbereiche. Die Dosis-Wirkungsfunktionen werden jedoch graphisch dargestellt und die daraus ermittelbaren ECx-Werte werden auch ausgegeben, um Ihnen einen Eindruck von der Datenlage zu vermitteln.

Alternativ können Sie einstellen, dass bei nicht-signifikanten Dosis-Wirkungs-Beziehungen weder Graphiken erzeugt noch EC-Werte angezeigt werden. Entfernen Sie dazu das Häkchen im Menü Options / Input-Output bei „Show ECx values and graphs also in case of non-significant dose/resp. relation“ (Abbildung 92).

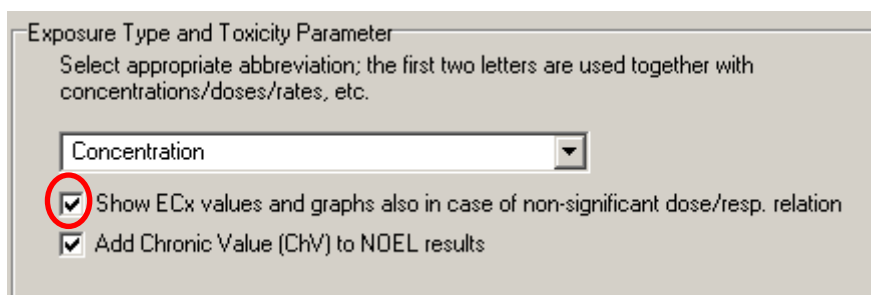


Abbildung 92: Menü Options / Input-Output, Einstellmöglichkeit für den Umgang mit nicht-signifikanten Dosis-Wirkungs-beziehungen

Zusätzlich zu den bis zu 6 frei wählbaren Effekt-Leveln, für die EC-Werte und Vertrauensbereiche ausgegeben werden (Kapitel 4.6 und Abbildung 31), kann ToxRat die gesamte Wertetabelle für die ermittelte Dosis-Wirkungs-Funktion von 0,1% Effekt bis 99,9% Effekt ausgeben, einschließlich oberen und unteren Vertrauensbereichsgrenzen. Setzen Sie dazu ein Häkchen bei „Add table with all ECx-values“ im Menü Options-Report (Abbildung 94). Achtung: Da die erzeugten Tabellen sehr umfangreich sind, werden sie nicht in den Ergebnis-Sheets gezeigt, sondern können als eigene Tabelle im Menüpunkt Tables unter dem Namen „<variablenname> ConcResp Function <Messzeitpunkt>“ ausgewählt und in einem eigenen Fenster angezeigt werden. In den Report werden sie automatisch integriert. Diese Option ist nicht variablenspezifisch einstellbar, sondern gilt generell für alle Variablen eines Workbooks.

6.5.4 Erzeugen von Übersichtstabellen

Sowohl für die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Analyse als auch für die Resultate der NOEC-Hemmwertbestimmung sind zusammenfassende Übersichtstabellen verfügbar (Beispiele finden Sie in Abbildung 93) – Sie können festlegen, ob und wann ToxRat diese anzeigen soll (Menu Options-Reporting, Abbildung 94):

- nur dann, wenn mehr als ein Messzeitpunkt ausgewertet wird (Voreinstellung)
- immer, auch wenn nur in Messzeitpunkt vorliegt
- nie

Die Einstellung gilt sowohl für die Ergebnisdatenblätter als auch für den Report.

Treatment [mg/L]	H	0-3 d %M	H	0-6 d %M
Control	74,0	7,5	76,0	5,0
1,500	62,0	22,5	70,0	12,5
3,300	62,0	22,5	64,0	20,0
7,200	58,0	27,5	60,0	25,0
15,900	48,0	40,0	50,0	37,5
32,000	28,0	65,0	36,0	55,0
LC10	n.d.		1,248	*pm
lower 95%-cl	n.d.		0,468	
upper 95%-cl	n.d.		2,162	
LC20	2,136	*pm	3,688	*pm
lower 95%-cl	0,000		2,117	
upper 95%-cl	5,645		5,312	
LC50	21,058	*pm	29,311	*pm
lower 95%-cl	8,380		19,324	
upper 95%-cl	20866,738		58,307	

Abbildung 93: Aufbau und Struktur von Übersichtstabellen zu Hemmwertbestimmung (links) und NOEC-Bestimmung (rechts).

The screenshot shows the 'Options' dialog box with several sections and callouts:

- Text Report:** Fields for 'Address of Institution/Company', 'Name', and 'Addition 1'. A callout points to the 'Name' field: "Optional: Methodenangabe in Übersichts- und oder Zusammenfassungstabelle".
- General:** Checkboxes for 'Automatically set actual date', 'Add Name of Computer to Page (a)', 'Add Username to First Page', 'Add a and b also to the Footer', and 'Allow Change of PDF'. A callout points to the 'Allow Change of PDF' checkbox: "Optional: Übersichtstabelle mit Hemmwerten zu Beginn jedes Messintervalls (Abbildung 95)".
- Reporting:** Checkboxes for 'Show header' and 'Show footer'. A callout points to the 'Show header' checkbox: "Optional: Ausgabe der gesamten Dosis-Wirkungsfunktion für Effekte von 0,1% bis 99,9% als Tabelle".
- Text Report and Workbook:**
 - Section: 'Indicate the Computation Method with the ELx and LOEL/NOELs:'.
 - Checkboxes: 'in all Overview Tables' (checked) and 'in the Summary Table'.
 - Checkboxes: 'Overview Table with Means, Numbers and Inhibitions at the Begin of each Timeperiod' (checked).
 - Section: 'Create NOELs Overview Table'.
 - Radio buttons: 'only when more than one measurement interval present (default)' (selected), 'also when only one measurement interval is present', 'never'.
 - Section: 'Create ELs Overview Table'.
 - Radio buttons: 'only when more than one measurement interval present (default)' (selected), 'also when only one measurement interval is present', 'never'.
- Other:** A checkbox 'Add table with all EC-values' is circled in red. A callout points to it: "Optional: Erzeugen von Übersichtstabellen für ECx und NOEC (vgl. Abbildung 93)".

Abbildung 94: Optionale Einstellungen für die Ergebnisausgabe im Auswahlfenster Options-Report. Gezeigt werden die programmseitigen Voreinstellungen.

Im Menü Options-Reporting legen Sie fest, ob in den erzeugten Übersichts- und Zusammenfassungstabellen auch die jeweils verwendeten statistischen Methoden angegeben werden sollen (in Form von Kürzeln, welche in der Legende erläutert werden) (Abbildung 94). Als Voreinstellung ist dies in den Übersichtstabellen der Fall, in der Zusammenfassungstabelle nicht. Die hier gewählte Einstellung gilt für alle Variablen im Workbook.

ToxRat erzeugt standardmäßig zu Beginn jedes Messzeitpunktes eine Übersichtstabelle mit den gemessenen Mittelwerten und Hemmwerten (Abbildung 95). Sie können dies Menü Options-Reporting abschalten (Abbildung 94).

Length in Danio rerio after 35 d.

%Reduction of length caused by the test item after 35 d.

Treatm.[mg/L]	Mean	Std. Dev.	n	%Reduction
Control	12,34	0,993	4	
1,500	11,02	0,768	4	10,7
3,300	10,72	0,208	4	13,1
7,200	10,53	0,202	4	14,7
15,900	9,95	0,173	4	19,4
32,000	7,75	0,289	4	37,2

Abbildung 95: Beispiel für eine optionale Übersichtstabelle mit Mittelwerten, Stichprobengrößen und Hemmwerten, wie sie zu Beginn jedes Messzeitpunktes angezeigt wird (Programmvoreinstellung).

6.5.5 Automatische Darstellung des Auswertedatums

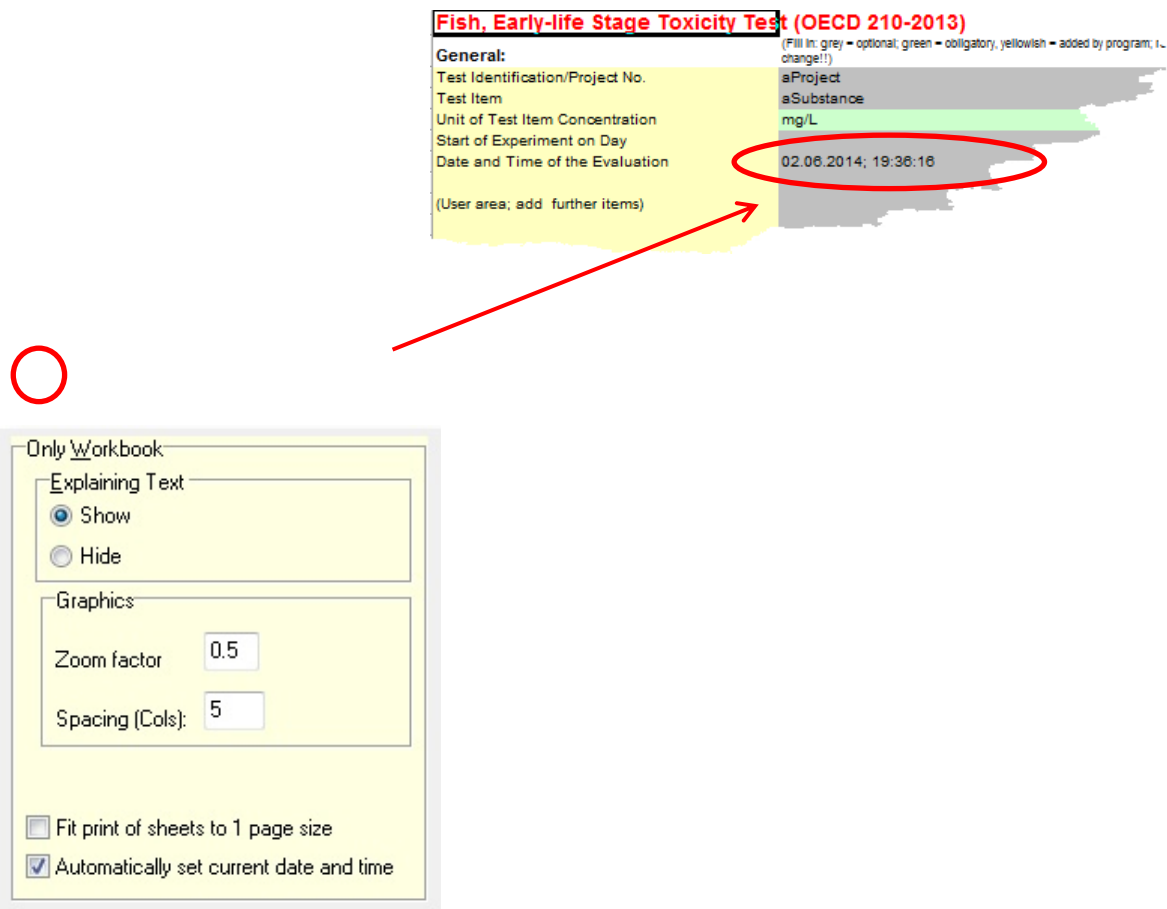


Abbildung 96: Menü Options – Reporting: Auswahl, ob Darstellung des Auswertedatums im Sheet General Notes; Voreinstellung: Ausgewählt

Programmseitig trägt ToxRat das Datum der jeweiligen Auswertung im Sheet General Notes in Zelle B7 ein („date and time of the evaluation“), und übernimmt dies auch in den Report. Wenn Sie dies nicht wünschen, entfernen Sie das Häkchen bei „Automatically set current date and time“ im Menü Options-Reporting (Abbildung 96). Ist die Option deaktiviert, so übernimmt ToxRat den aktuellen Inhalt der Zelle B7 als „date and time of evaluation“ in den Report, d.h. entweder Leereintrag oder benutzerspezifischer Inhalt.

7 Der Report

Oder: Wie Sie Ihre Ergebnisse präsentieren

Der Weg von den Ergebnissen bis zum Bericht ist kurz, denn ToxRat erstellt auf Knopfdruck einen vollständigen Report. Auch hierfür sind Voreinstellungen vorhanden, die Sie nutzen können. Aus GLP-Gründen⁵ können Reports nur anhand der Ergebnisse einer unmittelbar vorangegangenen Auswertung erzeugt werden, deshalb finden Sie den Befehl zur Reporterstellung nur im Ergebnisbildschirm, und zwar sowohl in der Menüzeile (Abbildung 97) als auch im Grafik-Fenster(Abbildung 98).

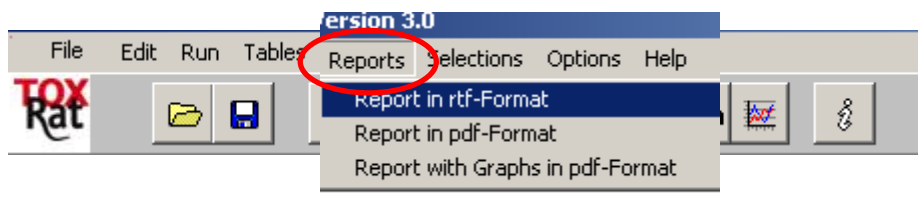


Abbildung 97: Befehle zur Reporterstellung in der Menüzeile des Ergebnisbildschirms

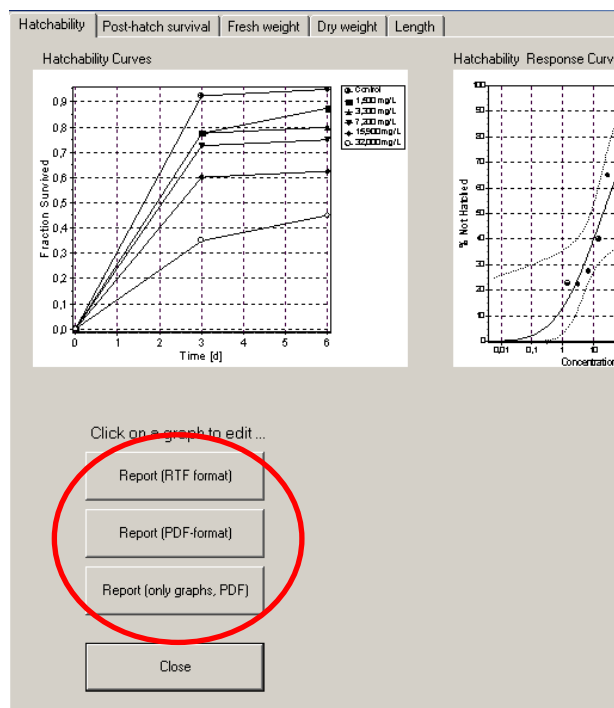


Abbildung 98: Befehle zur Reporterstellung im Grafikfenster

⁵ GLP = Good Laboratory Praxis

Es gibt drei verschiedene Reportvarianten:

- vollständiger Report im rtf-Format
- vollständiger Report im pdf-Format
- nur Grafiken im pdf-Format

Das rtf-Format weist zwei entscheidende Unterschiede zu den pdf-Reports auf:

1. Der in ToxRat erzeugte rtf-Report zeigt einen schwarzen Rahmen um alle Textseiten – daran ist er äußerlich als Primärreport erkennbar, welcher unmittelbar aus einer Auswertung erzeugt und nicht editiert wurde. Sie können den rtf-Primärreport direkt aus ToxRat heraus drucken. Bitte berücksichtigen Sie jedoch: ToxRat ist kein Textverarbeitungsprogramm! Die Formatierungen, Seitenvorschübe usw. im Primärreport sind möglicherweise nicht immer optimal.
2. Die erzeugte rtf-Datei kann gespeichert, in einem Textverarbeitungsprogramm geöffnet und editiert werden – dabei können Sie z.B. Formatierungen optimieren oder den Report an Ihre individuellen Vorlagen anpassen.



Der von ToxRat erzeugte rtf-Report ist äußerlich durch einen schwarzen Rahmen als nicht editierter Primärreport erkennbar. Er kann mit diesem Rahmen ausgedruckt und archiviert werden. Sobald der rtf-Report als Datei gespeichert und wieder geöffnet wird, verschwindet der schwarze Rahmen. Daran ist erkennbar, dass es sich um einen Sekundärreport handelt, dessen Inhalte möglicherweise editiert wurden.

Bevor ToxRat einen Report erstellt, können Sie im Berichtsfenster festlegen, welche Elemente enthalten sein sollen. Diese und andere Funktionen, die Sie bei der Reporterstellung unterstützen, erklären wir Ihnen im folgenden Abschnitt.

7.1 Menüs und Buttons im Berichts-Bildschirm

Sowohl die Auswahl eines rtf- als auch eines pdf-Reports öffnet ein Fenster mit speziellen Einstellmöglichkeiten für die Reporterstellung (Abbildung 99) (Ausnahme: pdf-Report nur Grafiken, hier ist keine Auswahl von Elementen möglich, der Report wird deshalb sofort erzeugt).

Auf der linken Seite des Report-Fensters sind alle bei der Auswertung erzeugten Rohdaten- und Ergebnistabellen, Graphiken, Zusammenfassungen und ggfls. das Ergebnis der Validitätsprüfung gelistet, sowie die jeweiligen Haupt- und Zwischenüberschriften. Die ausgewählten Elemente werden in den Report übernommen - per default sind das alle. Ein Klick auf die Schaltfläche „Generate Report“ startet die Reporterzeugung.

Wenn Sie bestimmte Elemente nicht in den Report aufnehmen möchten, können Sie das entsprechende Häkchen entfernen. Um Ihnen die Arbeit zu erleichtern, gibt es die Funktionen „Select all Items“ und „Clear Item List“ – damit können Sie mit einem Klick entweder alle Elemente auswählen oder alle abwählen.

Bei umfangreichen Biotests mit mehreren Variablen ist die Liste der Reportelemente sehr lang und es kann mühsam sein, immer wieder bestimmte Elemente, die entfernt oder hinzugefügt werden sollen, herauszusuchen. Deshalb gibt es die sogenannten Report-Profile:

Wenn Sie wiederholt Reports nach einem bestimmten Schema erstellen müssen, können Sie das jeweilige Reportprofil speichern („save report settings“). Wird dann das nächste mal ein Biotest nach dieser Guideline ausgewertet, so können Sie das gespeicherte Reportprofil verwenden („Use stored settings“). Pro Biotest können bis zu fünf verschiedene Reportprofile gespeichert werden.

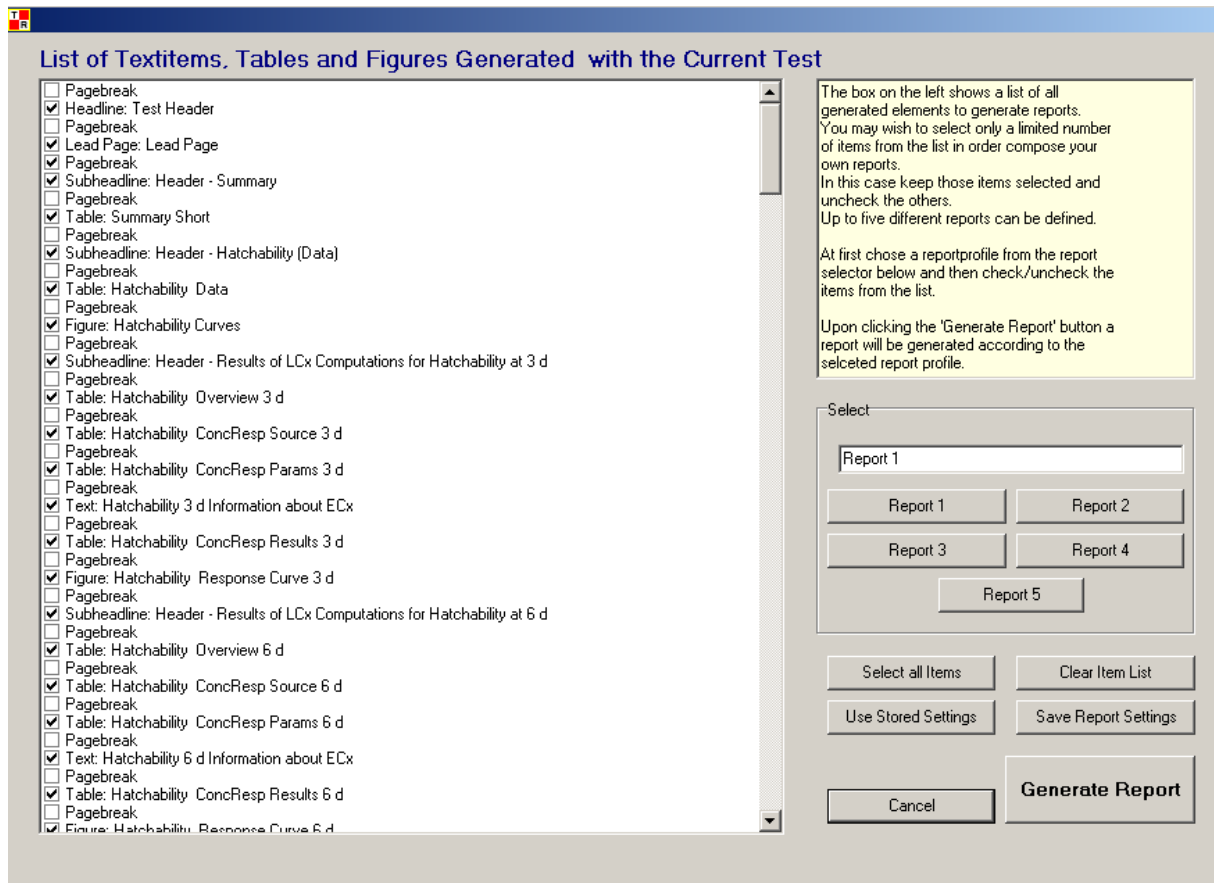


Abbildung 99: Fenster mit Einstellmöglichkeiten für die Report-Erstellung.

Wird ein pdf-Report erstellt, so fragt ToxRat Sie nach dem Speicherort, die pdf-Datei wird nach dem Speichern zur Ansicht geöffnet (vorausgesetzt, die entsprechende Funktion wurde nicht deaktiviert – vgl. Abschnitt 7.2). Wird ein rtf-Report erstellt, so sehen die den fertigen Report zunächst in einem neuen Fenster. Über das Menü „File“ dieses neuen Fensters können Sie diesen Report dann drucken und / oder speichern.

7.2 Optionale Einstellungen für den Report

Auch für den Report gibt es Voreinstellungen, mit denen Sie jederzeit und sofort mit einem Klick auf „Generate Report“ einen Report erzeugen können. Der Report beginnt standardmäßig mit einer sogenannten Titelseite, diese enthält die Angaben aus dem Datenblatt GeneralNotes zu Testbezeichnung, Substanz usw. darunter finden Sie das Ergebnis der Validitätsprüfung (Abbildung 100).

I

Fish, Early-life Stage Toxicity Test (OECD 210-2013): aProject

General:

Test identification/project no.	aProject
Test item	aSubstance
Unit of test item concentration	mg/L
Start of experiment on day	
Date and time of the evaluation	01.04.2014; 17:06:39
Raw data filename:	OECD210 Fish Early Life Stage 2013.xls

Test design

Number of treatments (incl. control(s))	6
Duration of the test	35 d
Measurement interval	35 d
Measurement variable	Hatchability, Survival, Weight and Length
Test system	Danio rerio
Statistical design	Hypothesis testing (NOEC) and regression (LCx)

Validity of the test

The test with Danio rerio requires a minimum hatching success of 70% and a minimum post-hatching success of 75% in the control to be valid.

In the present test 95,0% and 94,7%, respectively, of the introduced fish did survive; thus the test is valid.

Abbildung 100: Titelseite eines Reports, erzeugt mit Standardeinstellungen

„Fortgeschrittene“ können sich im Menüpunkt Options-Reporting über optionale Report-Einstellungen informieren (Abbildung 101).

Adresse

Auf Wunsch können Sie hier Ihre Adressdaten eingeben, diese werden oben auf die Report-Titelseite gedruckt, wenn angeklickt ist „Insert Adress in Report“. Die Eingabe oder Änderung der Adressdaten erfordert einmalig Administratorrechte.

Zusammenfassung

Standardmäßig beginnt der Report mit einer Kurzzusammenfassung, d.h. einer Übersicht über alle Ergebnisse für den letzten Messzeitpunkt. Am Ende des Report findet sich dann die vollständige Zusammenfassung, d.h. einschließlich aller Zwischenmesszeitpunkte. Wenn Sie die vollständige Zusammenfassung zu Beginn sehen möchten, aktivieren Sie das Kästchen „Start report with full summary“.

Angaben im Rahmen der GLP

ToxRat kann den Computernamen und den Namen des eingeloggten Benutzers auf der Titelseite oder in der Fußzeile des Reports anzeigen, wenn Sie die entsprechenden Optionen aktivieren.

Options

Input/Output | Reporting | Hypothesis Testing (NOEL | Limit Level) | Point Estimation (ELx) | Fish Test (OECD210-2013)

Text Report

Address of Institution/Company

Name: ToxRat Solutions GmbH

Addition 1:

Addition 2:

Street: Naheweg 15

Country code: D Postal code: 52477 City: Alsdorf

Country: Germany

Insert address in report Start report with full summary

Entering the address items requires administrator privileges

Report Format

	cm before	after
Variable header	0,087	0,087
Sub header	0,087	0,087
Table line	0,087	0,087
Text line	0,087	0,087

Page Margins [cm]

Top: 2

Left: 2

Right: 1,5

Bottom: 2

Don't Show Table and Figure Numbers

Show header

Show footer

Add rawdata-sheet name to Report-rawdata-table Caption

Add table with all EC-values

Explaining Text

Show

Hide

Pagebreak

after: 35 lines

General

Automatically set actual date and time

Add Name of Computer to First Page (a)

Add Username to First Page (b)

Add a and b also to the Footer

PDF Export

Launch Acrobat Reader after Export

Allow Change of PDF Properties

Abbildung 101: Menu für optionale Einstellungen zur Reporterstellung; gezeigt: Standardeinstellungen

8 GLP Konformität, Validierung

Die folgenden Eigenschaften von ToxRat tragen dazu bei, GLP-Anforderungen zu erfüllen:

Unveränderbar

Alle Datenvorlagen können direkt in ToxRat ausgefüllt und bearbeitet werden (integriertes Tool zur Dateneingabe, näheres hierzu siehe Kapitel 3.4 und 3.5.). MS Excel ist dazu nicht erforderlich. Insbesondere sämtliche Auswertungen werden ausschließlich ToxRat intern durchgeführt, ohne dass dazu MS Excel-Funktionen verwendet werden. Das heißt, ToxRat ist auf jedem Rechner mit Windows-Betriebssystem lauffähig, unabhängig davon, ob irgendwelche anderen Programme, insbesondere MS Excel, a) überhaupt installiert sind und b) in welcher Version.

Der Primärreport kann grundsätzlich nur anhand einer *unmittelbar vorangegangenen Auswertung* erzeugt werden, d.h. er wird stets von einer internen Originalkopie der Ergebnisse erstellt. Im Verlaufe einer Programmsession durchgeführte manuelle Änderungen in den Ergebnissen werden nicht übernommen. Dadurch ist es nicht möglich, Ergebnistabellen zu verändern, ehe sie in den Report übernommen werden. Der Primärreport kann abgespeichert und – falls Format rtf gewählt - natürlich auch editiert werden. Jedoch ist der direkt ausgedruckte Primärreport äußerlich unterscheidbar von einem archivierten (und ggfls. editierten) Report. Der Report enthält auf Wunsch Angaben über die verwendete ToxRat-Version, Rohdaten-Filename, Auswertedatum, Rechner-Name, Benutzername usw. (Näheres siehe Kapitel 7).

Überprüfbar

Die in ToxRat verwendeten Algorithmen und statistischen Verfahren sind geprüft. Zum Lieferumfang gehört ein Validierungsdokument, in dem sämtliche im Programm verwendeten Methoden und Verfahren einschließlich der zugrunde liegenden Formeln erläutert werden. Außerdem werden alle mathematischen und statistischen Verfahren auf standardisierte Testdatensätze angewendet und die Ergebnisse verifiziert, indem sie mit unabhängigen Berechnungen (z.B. MS EXCEL) und Literaturdaten verglichen werden.

Nachvollziehbar

Die Testdatensätze gehören zum Lieferumfang der Software, so dass Sie als Anwender diesen Schritt der Qualitätskontrolle selbst nachvollziehen und außerdem vor Ort prüfen können, ob die Software auch in Ihrer individuellen Konfiguration die im Validierungsdokument genannten Ergebnisse liefert.

Weitere Informationen hierzu finden Sie im Validierungsdokument.

9 Installation

9.1 Lokale Installation

Führen Sie die Installationsdatei aus.

Während des Installationsprozesses und beim ersten Aufruf des Programms, bei dem auch die Registrierung erfolgt, sind volle Administrator-Rechte erforderlich. Achtung: der erste Aufruf muss unter dem Benutzernamen erfolgen, unter dem das Programm später auch gestartet werden soll.

Sollten Sie die Fehlermeldung erhalten „You need full administrator privileges to start ToxRat“, dann beachten Sie bitte: ToxRat erkennt Domänen Accounts mit lokalen Adminrechten nicht als Nutzer mit Adminrechten. Die Installation funktioniert zwar, aber beim Start erhalten Sie die genannte Fehlermeldung und das Programm wird geschlossen. Lösung: Legen Sie auf dem betreffenden PC einen lokalen User an und nehmen Sie diesen in die lokale Admingruppe auf.

Bitte beachten Sie auch, dass unter WIN7 das Konto mit vollständigen Administratorrechten standardmäßig deaktiviert und nicht sichtbar ist. Falls ToxRat nach dem Aufruf sofort wieder schließt, ohne den Registrierungsbildschirm zu zeigen, aktivieren Sie bitte das Sonder-Administratorkonto und wiederholen Sie den Programmstart als angemeldeter Administrator (Kontotyp "Administrator" reicht möglicherweise nicht aus!).

Während der Installation werden einige für die Programmausführung notwendigen Systemdateien ins Windows-Systemverzeichnis kopiert. Jede Programmvariante (Standard, Monitor, Professional oder Professional XT) wird standardmäßig in ein eigenes Programmverzeichnis installiert. Die im Folgenden angegebenen Pfadangaben gelten für Installation unter WIN7.

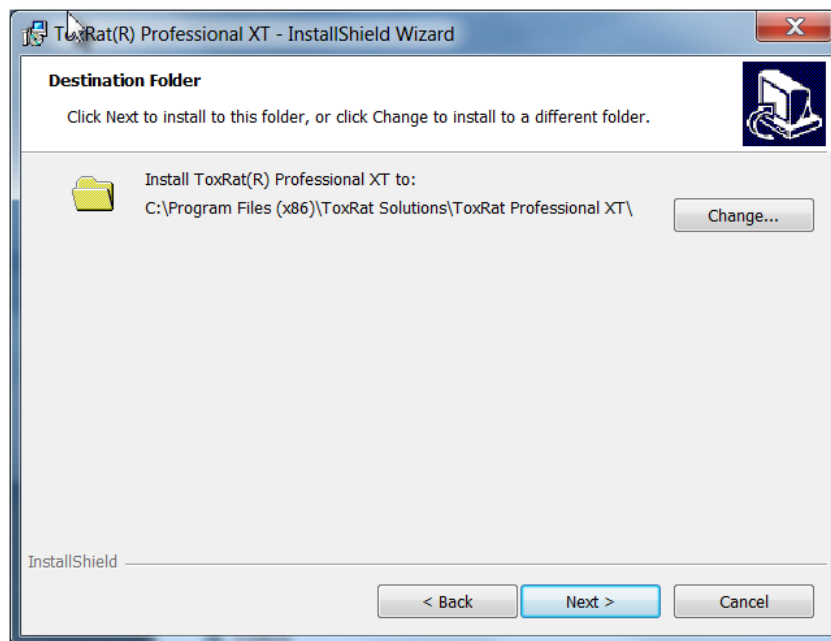


Abbildung 102: Voreingestelltes Programmverzeichnis für Installation unter WIN7.

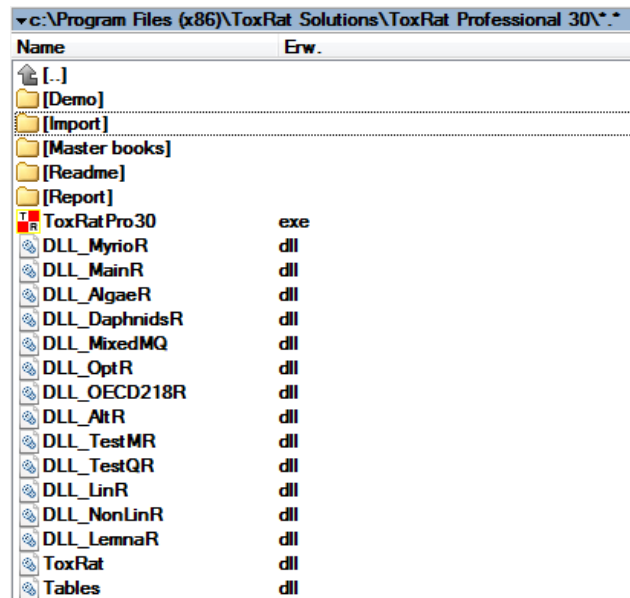


Abbildung 103: Während der Installation automatisch angelegte Dateistruktur im Programmverzeichnis.

Im Programmverzeichnis befinden sich nach der Installation die ToxRat.exe-Datei sowie die in Abbildung 103 gezeigten Dateien und Ordner.

Bitte beachten Sie: In den downloadbaren Installationsdateien sind die Handbuchvarianten (deutsch / englisch) nicht enthalten, um die Datei möglichst klein zu halten. Bitte laden Sie sich Ihre Handbuchversion von unserer Website herunter!

Die Datei **ToxRat.dll** wird beim ersten Programmstart in ein speziell angelegtes, benutzerspezifisches Verzeichnis kopiert (siehe unten). Sie dient dort dazu, die folgenden benutzerspezifischen Einstellungen zu speichern:

- Adressangaben für den Report;
- Pfade zu den Verzeichnissen, in denen ToxRat nach Workbooks und Masterbooks sucht,
- Pfad zu dem Verzeichnis, in dem die Settingsdateien (= Einstellungen zu statistischen Methoden für bestimmte Workbooks) abgespeichert werden.

Die Datei **Tables.dll** enthält statistische Tabellen, die **übrigen dll-Dateien** enthalten Biotestspezifische und methodenspezifische Texte. Auf die dll-Dateien wird während der Auswertungen zugegriffen, es sind deshalb Leserechte im Programmverzeichnis erforderlich.

Beim ersten Programmstart nach der Installation erscheint das Registrierungs Fenster. Geben Sie dort Ihren individuellen Benutzernamen und Registrierungsschlüssel ein, die Sie beim Lizenzerwerb erhalten haben.

ToxRat setzt die Installation dann fort. Beim ersten Programmstart erscheint der Begrüßungsbildschirm (Abbildung 104) und es werden die folgenden zwei benutzerspezifischen Verzeichnisse angelegt (deshalb muss der Erstaufruf unter dem Benutzernamen des Anwenders erfolgen, der ToxRat später verwenden wird);

- 1) C:/User/<username>/Documents/ToxRat Professional
- 2) C:/User/<username>/Appdata/Local/ToxRat Professional

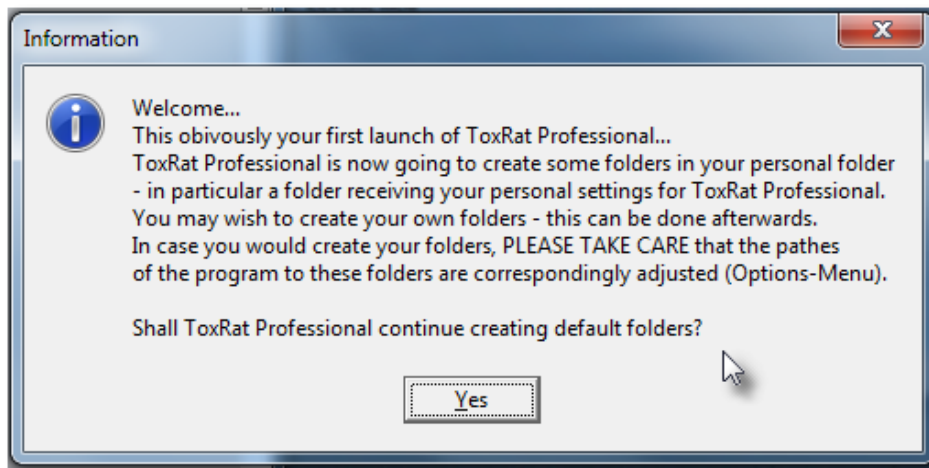


Abbildung 104: Begrüßungsfenster beim ersten Programmstart.

Zu 1) C:/User/<username>/Documents/ToxRat Professional (Abbildung 105)

Dieses Verzeichnis schlägt ToxRat zur Speicherung der vom Benutzer erstellen Berichte vor und hier sucht ToxRat automatisch nach zu öffnenden, benutzereigenen Workbooks (im Gegensatz zu den mitgelieferten Demo-Workbooks, die im Programmverzeichnis zu finden sind). Die Ordner „Report“ und „Workbooks“ sind zu Beginn noch leer. Sie können die jeweiligen Zielordner nach Abschluss der Installation unter Options / Input-Output jederzeit ändern. Z.B. kann es während der Einarbeitungsphase sinnvoll sein, mit Demo-Workbooks zu arbeiten. Dazu können sie den Pfad für die Workbooks wieder auf den Demo-Ordner im Programmverzeichnis setzen (Abbildung 107). Alternativ können Sie auch Kopien der Demo-Ordner in Ihr persönliches Verzeichnis übernehmen.

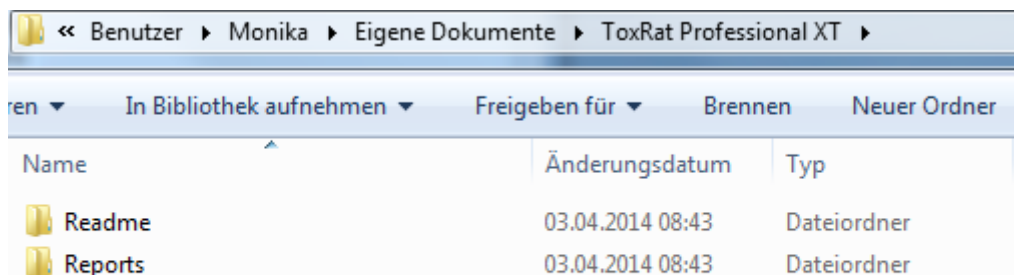


Abbildung 105: Während der Installation automatisch angelegter Ordner unter „Eigene Dokumente“, vorgesehen zur Ablage von eigenen Workbooks und Berichten.

Zu 2) C:/User/<username>/Appdata/Local/ToxRat Professional

Dieses Verzeichnis enthält stets:

- **Temporäre Grafik-Dateien mit der Endung .wmf.** Wird während des Programmlaufs eine Grafik erzeugt, so wird diese hier temporär als wmf-File gespeichert. Beim Schließen von ToxRat werden alle wmf-Files automatisch gelöscht.

Dieses Verzeichnis enthält außerdem die folgenden persönlichen Einstellungen für das Programm („personal settings“). Dies ist jedoch optional, d.h. Sie können das Zielverzeichnis nachträglich jederzeit ändern unter Options/Input-output, Abbildung 107) :

- Die **Datei ToxRat.dll**; enthält Reportadresse, Pfad für Settingsdatei, Pfade für mitgelieferte Demo-Workbooks und Masterbooks, Pfade für benutzerspezifische Workbooks und für Reports (siehe oben). Wenn die Datei ToxRat.dll in diesem Verzeichnis nicht existiert, erscheint beim Programmstart das Begrüßungsfenster „Erstaufruf“ (siehe Abbildung 104) und sie wird aus dem Programmverzeichnis hierher kopiert (dann zunächst mit programmseitig eingestellten Pfaden und Verzeichnissen).
- Die **Einstellungsdatei ToxRatPro3.0.0.stp**; diese enthält programmseitige Voreinstellungen zu den verschiedenen statistischen Methoden und Biotests. Wenn die Datei ToxRatPro3.0.0.stp beim Programmstart nicht existiert, wird sie neu angelegt.
- **Biotestspezifische Einstellungsdateien mit der Endung .stp.** Wird ein Workbooktyp erstmalig aufgerufen, legt ToxRat eine entsprechende stp-Datei für diesen Workbook-Typ in diesem Verzeichnis an. Diese enthält programmseitige Voreinstellungen zur Auswertung. Benutzerseitige Änderungen werden in der workbookspezifischen Settingsdatei dauerhaft gespeichert und beim nächsten Aufruf eines Workbooks gleichen Typs automatisch angewendet. Damit verschiedene Benutzer jeweils individuelle Settings verwenden können, sollten die stp-dateien in benutzerspezifischen Verzeichnissen gespeichert werden. Wird ein Workbook aufgerufen, für das noch keine stp-Datei existiert, so legt ToxRat eine an (mit programmseitigen Voreinstellungen)



Hinweis für Benutzer von früheren ToxRat Versionen: Ab ToxRat 3.0 werden benutzerspezifische Einstellungen zu statistischen Methoden und Biotests nicht mehr in einer zentralen settings-Datei gespeichert, sondern Biotest-spezifisch. Das bedeutet, dass bei zukünftigen Updates nur diejenigen settings-Dateien erneuert werden müssen, bei denen sich Änderungen ergeben haben. Einstellungen für nicht betroffene Biotests können Sie über die spezifischen settings-Dateien ins Update übernehmen (z.B. komplexe Report Profile).

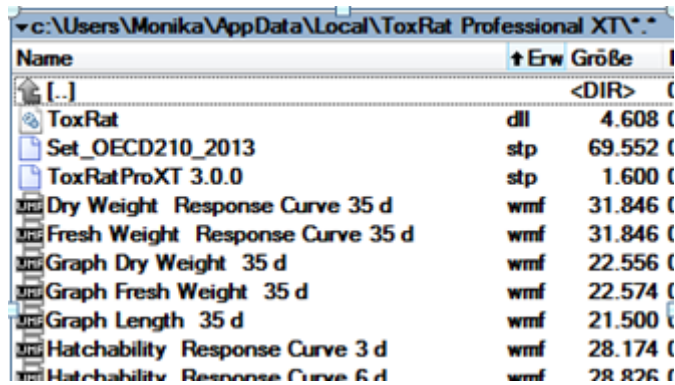


Abbildung 106: Benutzerspezifischer Ordner zur Speicherung von Einstellungsdateien (*.dll, *.stp, permanent) und Grafikdateien (*.wmf, temporär).

Nachdem diese beiden Verzeichnisse angelegt wurden, startet das Programm. Für weitere Aufrufe benötigen Sie keine Adminrechte mehr.

Unter dem Menüpunkt Options / Input-Output sehen Sie nun eine Übersicht über die angelegten Verzeichnisse und die programmseitig voreingestellten Pfade (Abbildung 107). Änderungen sind möglich – für einige zentrale Pfadänderungen sind jedoch einmalig Administratorrechte erforderlich.

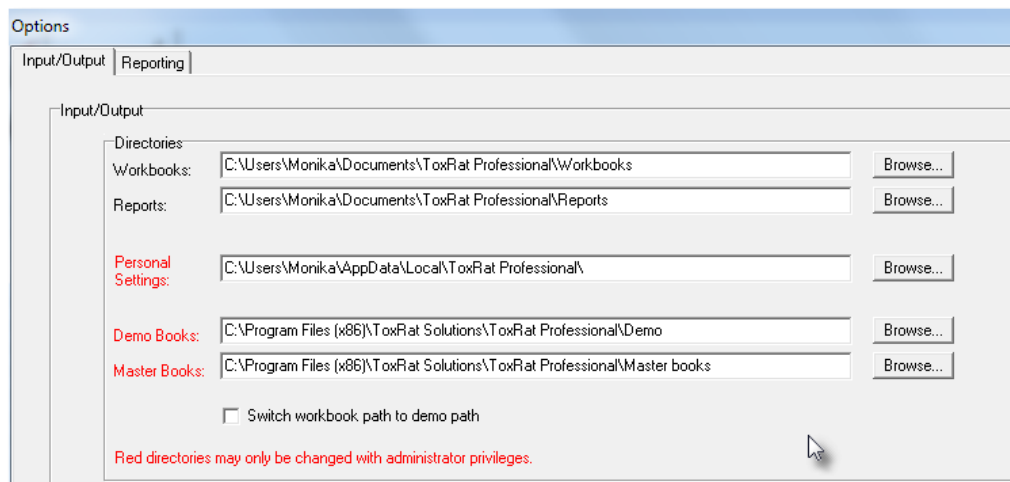


Abbildung 107: Einstellmöglichkeiten für Verzeichnisse und Ordner im Menü Options / Input-Output, gezeigt: programmseitige Voreinstellungen.

9.2 Server- Installation

ToxRat läuft sowohl in einem Client-Server-Netzwerk (auf jedem angeschlossenen Computer ist das Betriebssystem Windows installiert) als auch in einem Terminal-Server-Netzwerk (angeschlossene Computer ohne eigenes Betriebssystem).

Bitte lesen Sie zunächst die Informationen zur lokalen Installation – die angelegten Verzeichnisse und die Vorgehensweise gelten auch für die Server-Installation. Führen Sie zunächst das Installationsprogramm für ToxRat auf dem Server aus.

Bei einer **Client-Server-Konfiguration** führen Sie anschließend auf jedem angeschlossenen Computer das Programm Client.exe aus – dieses kopiert auf dem jeweiligen lokalen PC bestimmte Systemdateien, die für die Programmausführung erforderlich sind, ins Windows-Systemverzeichnis. Dann rufen Sie ToxRat auf jedem angeschlossenen Computer unter dem jeweiligen Benutzernamen des Anwenders auf – beim Erstaufruf erfordert dies Adminrechte. Es wird dann auf jedem lokalen Computer die in Kapitel 9.1 beschriebene, benutzerspezifische Dateistruktur angelegt. Die Pfade können Sie anschließend ändern – für den Pfad für Settings-Dateien, Demo-Workbooks und Masterbooks erfordert dies ebenfalls Admin-Rechte.

Darüber hinaus beachten Sie bitte bei einer Server-Installation folgende Hinweise:

1. Bitte stellen Sie sicher, dass die Anwender Leserechte für die dll-Dateien im Programmverzeichnis auf dem Server haben.
2. Mitgelieferte Demo- und Masterbookdateien sind standardmäßig im Programmverzeichnis auf dem Server abgelegt. Falls Sie diese an einem anderen zentralen Ort verfügbar machen wollen, so kopieren Sie die entsprechenden Verzeichnisse bitte an den neuen Speicherort; setzen Sie anschließend auf jedem lokalen PC die entsprechenden Pfade im Options-Menü.
3. Die Workbook- und biotestspezifischen Settings-Dateien sollten benutzerspezifisch abgespeichert werden, damit die Anwender sich nicht gegenseitig ihre individuellen Einstellungen überschreiben. Jeder Anwender benötigt in dem entsprechenden Verzeichnis Lese- und Schreibrechte.

9.3 ToxRat deinstallieren

Deinstalliert wird nur das entsprechende Programmverzeichnis sowie die Dateien im Systemverzeichnis. Die Ordner in den benutzerspezifischen Verzeichnissen (siehe Kapitel 9.1) bleiben erhalten.

10 Mitgelieferte Datenvorlagen

Im Folgenden sehen Sie eine Übersicht aller in ToxRat 3.0.0 grundsätzlich auswertbaren Biotests (nicht alle ToxRat Programme enthalten alle Datenvorlagen – siehe hierzu Kapitel 2).

Für Biotests, die in verschiedenen Varianten durchgeführt werden können, gibt es jeweils mehrere Vorlagen z.B. OECD 201 (Zellzahlen, Extinktion, Fluoreszenzen). Diese Listen sehen Sie beim Öffnen eines Workbooks oder Masterbooks. Die jeweilige Anwendung wird durch den Dateinamen deutlich.

OECD 201	Algae, Growth Inhibition Test
OECD 202	Daphnia spec., Acute Immobilisation Test
OECD 203	Fish, Acute Toxicity Test
OECD 204	Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study
OECD 205	Avian Dietary Toxicity Test
OECD 206	Avian Reproduction Test
OECD 207	Earthworm, Acute Toxicity Test
OECD 208	Terrestrial (Non-target)-Plant test: 208A: Seedling Emergence and Seedling Growth, 208B: Vegetative Vigour Test
OECD 209	Activated Sludge, Respiration Inhibition Test
OECD 210	Fish, Early-Life Stage Toxicity Test
OECD 211	Daphnia magna Reproduction Test
OECD 212	Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages
OECD 213	Honeybees Acute Oral Toxicity Test
OECD 214	Honeybees Acute Contact Toxicity Test
OECD 215	Fish, Juvenile Growth Test
OECD 216	Soil Microorganisms, Nitrogen Transformation Test
OECD 217	Soil Microorganisms, Carbon Transformation Test
OECD 218	Sediment Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment
OECD 219	Sediment Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water
OECD 220	Enchytraeidae Reproduction Test
OECD 221	Lemna sp. Growth Inhibition Test
OECD 222	Earthworm Reproduction Test (<i>Eisenia fetida</i> / <i>andrei</i>)
OECD 223	Avian Acute Oral Toxicity Test
OECD 225	Lumbriculus Toxicity Test
OECD 226	Predatory Mite (<i>Hypoaspis</i>) Reproduction Test in Soil
OECD 227	Terrestrial Plant Test Vegetative Vigour
OECD 235	Chironomus Acute Test
OECD 236	Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET)
OECD 237	Honeybees Larval Toxicity Test
OECD 238	Myriophyllum spicatum Sediment-Free Toxicity Test
OECD 239	Myriophyllum Water-Sediment Toxicity Test

OCSPP	850.5400 Algal Toxicity - Tiers I and II
IOBC	Mortality and Reproduction of <i>Typhlodromus pyri</i>
IOBC	Survival and Viability of <i>Aphidius rhopalosophi</i>
DIN EN ISO 11348	Luminescence Inhibition
DIN EN ISO 15088	Acute Toxicity of Waste Water to Eggs of <i>Danio rerio</i>
DIN EN ISO 17512-1	Earthworm Avoidance Test
DIN EN ISO 17512-2	Collembola Avoidance Test
DIN EN ISO 20079	Duckweed Growth Inhibition
DIN EN ISO 6341	Daphnia Acute Test
DIN EN ISO 7346	Fish Acute Toxicity Test
DIN EN ISO 8692	Algae Growth Inhibition Test
DIN 38412 L9 + L33	Algae Growth Inhibition
DIN 38412-L30 + L11 + L40	Daphnia Acute
DIN 38412 L31 + L15	Fish Acute
DIN 38415-T6	Fish Eggs
DIN EN ISO 06341	Daphnia Acute Test
DIN EN ISO 8692	Algae Growth Inhibition
DIN EN ISO 11348	Luminescent Bacteria Test
ISO WD 11350	Ames Fluctuationtest
ISO 10706	Daphnia magna Longterm Test
ISO 10871	Solid Contact Test with <i>Arthrobacter globiformis</i>
ISO 10872	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ISO 11267	Inhibition of reproduction of Collembola
ISO 11350	Ames Fluctuation Test
ISO 16191	<i>Myriophyllum aquaticum</i> Sediment Test
ISO 20665	<i>Ceriodaphnia</i> Population Growth Inhibition Test

Darüberhinaus enthält ToxRat unspezifische Datenvorlagen für metrische und quantale Variablen sowie für die Auswertung eines Parallel Line Assay (Potency Estimation) gemäß Pharmacopeia.

11 Index

A

Abbott-Korrektur · 56
Absolutzahlen · 16
AIC · 105
Akaike-Kriterium · 105
alpha-Kumulation · 74, 76
Ausreißertests · 76, 97
Auswertebildschirm · 23
Auswerte-Ebenen · 3

B

Behandlungen · 15
Bestimmtheitsmaß · 104
Binomialverfahren · 67
Biotest · 2, 3
Biotest-Workbook · 12
Blattschutz · 21
Bonferroni-Korrektur · 76
Bootstrap · 55
Bootstrapping · 64
Bootstrap-Verfahren · 57
Bruce-Versteeg · 60, 62

C

Chronic Value (ChV) · 112
Cumulative distribution function, CDF · 59
Cumulative distribution functions, CDF · 57

D

Datenblätter · 11
Dateneingabe · 18
Datentabellen · 94
Datentransformation · 27, 45, 70
Datenvorlage · 4, 5
Datenvorlagen · 1, 2, 3, 8, 10, 19
default settings · 5, 33
Design · 13
Dezimalstellen · 13, 109
Dezimaltrennzeichen · 109
Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht signifikant · 99, 114
Dosis-Wirkungs-Funktion alle Werte · 114
Downhill-Simplex · 57, 64

E

EC-Wert extrapolieren · 50

Editieren · 19
Effekt Level · 50
Einstellungen dokumentieren · 113
Ergebnisse anhängen · 32, 71
Ergebnisse Erläuterung · 95
Ergebnisse Zusammenfassung · 96
Ergebnisse, Methoden darstellen · 116
Ergebnistabellen · 94
Ergebnistabellen Anordnung · 95
Excel · 4
Excel Formate · 19
Expertensystem · 1
Expertenwissen · 2, 29, 30
Externer Standard · 41
Extrapolation · 50
Extrapolationsbremse · 50
Extrapolationsfaktor · 50

F

Farbcodierung · 12
Fieller's Theorem · 55
Förderungen · 62
Formatierung · 109
Fudging · 52
Funktionsparameter, Anzahl · 60

G

General Notes · 4, 11, 12
Generic Data · 3, 13, 14
Gewichtung · 62
GLPAnforderungen · 123
goodness of fit · 99
Graphiken · 90
Graphiken editieren · 92
Graphiken exportieren · 92
Grubbs-Test · 77
Guideline · 2, 3, 12
Gütekriterien · 58, 60, 98, 103, 104

H

Hampel-Test · 77
Haupttest · 38, 40, 44
Heterogenitätskorrektur · 56, 99
Hormesis · 62

I

Installation · 124
Installation, Dateistruktur · 129
Irrtumswahrscheinlichkeit · 40, 44, 70, 74

K

Kalibrierung · 83
Kommastellen, Einstellung · 109, 111
Kontext spezifisch · 6, 23, 31, 69
Kontrastanalyse · 75
Kontrollkonzentration · 61
Konvergenz · 103

L

Lack of fit · 103
Lack of Fit · 105, 106
Levenberg Marquardt · 57
Levenberg-Marquardt · 64
Lösungsmittelkontrolle · 78

M

Masterbook · 4, 8
maximum-likelihood-Verfahren · 55
Messwiederholungen · 82
Messzeitpunkte · 15, 16, 17
Methodenanzeige in Ergebnistabellen · 97
metrisch · 3, 13, 15, 17
Metrische Variablen · 14
minimum detectable difference, MDD · 108
Monotonie · 74
Monte Carlo Simulation · 57
Monte-Carlo Simulation · 64
Moving Average · 67

N

Nachkommastellen · 109
Nachweisgrenze · 108
NOEC · 35
Normal Approximation · 55
Normalisierung · 52, 60

O

Optimierungszyklen Anzahl · 64
Organismus · 13, 14

P

Paarweise Vergleiche · 47
Poisson Wichtung · 62
Positivkontrolle · 41
Primärreport · 119, 123

Q

quantal · 3, 13, 15, 16
Quantale Variablen · 14

R

R^2 · 105
Refresh · 18, 23, 24
repeated measurements · 82
Replikate · 15
Report erstellen · 118
Report Format rft, pdf · 119
Report Profile · 120
restore default settings · 33
Restvarianz · 105
Richtlinie · 6
RUN · 24
Runden · 111

S

Schema nicht-lin. Regression · 58
Schema zur Testauswahl · 35
Seitigkeit · 31, 70
Sekundärreport · 119
Selection-Menu · 26
Selections · 26
Settingsdatei · 33, 127
signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung · 106
Signifikanz nichtlineare Regression · 105
Signifikanzniveau · 31, 41, 44, 70
Spearman Körber · 67
Standardeinstellungen · 34, 39
Startbildschirm · 6
Startparameter · 59
Stop reason · 103

T

Tabellen · 94
Tabellen, Übersicht · 114
Test Design · 14
Testschema zur NOEC-Bestimmung · 35, 36
Teststärke · 36, 108
Transformation · 26, 27, 45, 46

V

Validierung · 5
Validitätskriterien · 13, 80
Variable · 13
Variablentypen · 15
Varianz · 31
Varianzkorrektur · 52
Varianzkorrektur für Vertrauensbereich · 56

Vertrauensbereich · 55
Verzeichnisse automatisch angelegt · 125
Voreinstellungen · 53, 54
Vortests · 38, 41, 44

Wichtung Poisson · 62
Wichtung relativ · 62
Workbook · 4, 8, 9
Workbookdesigner · 4, 19

W

Wichtung nach Varianz · 62

Z

Zellen gesperrt · 19