Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Estatística
Disciplina: 7210 – Modelos Não Lineares
Professor: Dr. Josmar Mazucheli
Acadêmico: André Felipe Berdusco Menezes

Antibodies Anticoronavirus Assayed by an ELISA Test: Comparing Several Response Curves

Maringá
Julho de 2017

1 Introdução

Neste trabalho será apresentada a análise dos dados referente a seção 1.1.3 (*Antibodies Anticoronavirus Assayed by an ELISA Test: Comparing Several Response Curves*) do livro escrito por Huet et al. (2004).

Este conjunto de dados é proveniente de um experimento o qual utilizou-se um teste ELISA[1] para detectar a presença de anticorpos no soro de bezerros e vacas. O problema se restringe à comparação dos níveis de anticorpos em duas amostras de soro colhidas em Maio e Junho de uma determinada vaca. Assim, a variável resposta refere-se aos resultados do teste ELISA, nos quais são uma coleção de densidades ópticas observadas para diferentes diluições de soro.

Uma representação gráfica dos dados é apresentada na Figura 1. Nota-se um comportamento decrescente da densidade ótica conforme o aumento no log da diluição, entretanto esta conduta decrescente é identificada como sendo uma curva sigmoide, ou seja, uma curva com formato de S ou S invertido.

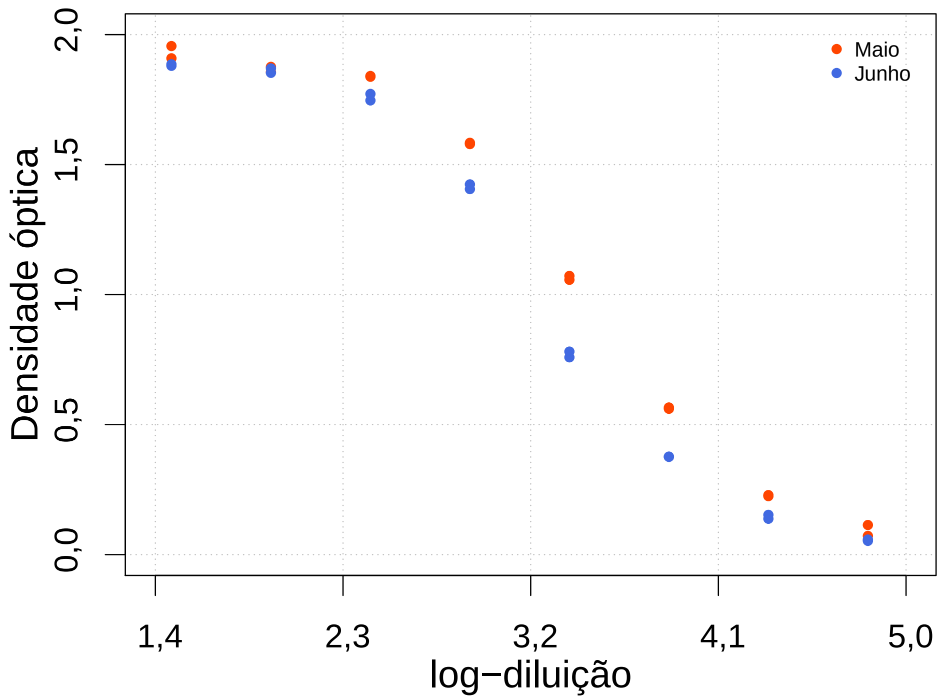

Figura 1: Comportamento da variável resposta conforme a covariável (log-diluição) e o mês.

[1]Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos

2 Metodologia

Os modelos de regressão, em sua forma univariada, são utilizados para descrever o comportamento de uma variável aleatória Y, como uma função condicional a(s) variável(is) explicativa(s) $\boldsymbol{x}$. Em particular, nos modelos não lineares a relação entre Y e $\boldsymbol{x}$ é descrita por uma função esperança não linear nos parâmetros. Explicitamente temos:

$$\mathbb{E}(Y \mid \boldsymbol{x}) = f(\boldsymbol{x}, \boldsymbol{\theta}) + \boldsymbol{\varepsilon} \tag{1}$$

em que $\boldsymbol{x}$ é o vetor de variável explicativa, $\boldsymbol{\theta}$ é o vetor de parâmetros desconhecidos e $\boldsymbol{\varepsilon}$ é o vetor de efeitos aleatórios. Em geral, assume-se que os erros são variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas normais com média $\mathbf{0}$ e variância constante σ^2. Consequentemente, conforme propriedades da distribuição Normal temos que:

$$Y \mid \boldsymbol{x} \sim N(f(\boldsymbol{x}, \boldsymbol{\theta}), \sigma^2) \tag{2}$$

Assim, inferências para o vetor de parâmetros $\boldsymbol{\theta}$ podem ser realizada sob o paradigma da verossimilhança (ver, por exemplo, Lehmann and Casella, 1998; Pawitan, 2001). Supondo o pressuposto estabelecido em (2) e dada uma amostra aleatória da forma $(y_i, x_{ip}), i = 1, \dots, n$ e $p < n$, a função de verossimilhança para $\boldsymbol{\theta}$ e σ^2 pode ser escrita na forma:

$$L(\boldsymbol{\theta}, \sigma^2 \mid \boldsymbol{y}, \boldsymbol{x}) = (2\pi)^{-n/2} \, (\sigma^2)^{-n/2} \prod_{i=1}^{n} \exp\left[-\frac{1}{2\,\sigma^2} \, (y_i - f(x_i, \boldsymbol{\theta}))^2 \right] \tag{3}$$

Logo, a bem conhecida log-verossimilhança é dada por:

$$\ell(\boldsymbol{\theta}, \sigma^2 \mid \boldsymbol{y}, \boldsymbol{x}) = -\frac{n}{2} \log(2\,\pi) - \frac{n}{2} \log(\sigma^2) - \frac{1}{2\,\sigma^2} \sum_{i=1}^{n} \, (y_i - f(x_i, \boldsymbol{\theta}))^2 \tag{4}$$

As estimativas de máxima verossimilhança, $\widehat{\boldsymbol{\theta}}$ e $\widehat{\sigma}^2$ são obtidas maximizando (4) em relação a $\boldsymbol{\theta}$ e σ^2. Testes de hipóteses e intervalos de confianças para os parâmetros são realizados a partir das propriedades assintóticas dos estimadores de máxima verossimilhança (Lehmann and Casella, 1998).

No que tange o problema descrito na seção anterior os autores assumem que a relação entre a densidade óptica, Y, e o logaritmo da diluição, $x = \log_{10}(1/d)$, é modelada por uma curva sigmoide. Além disso, a função esperança considerada é definida pela expressão:

$$f(x, \boldsymbol{\theta}) = \theta_1 + \frac{\theta_2 - \theta_1}{1 + \exp\left[\theta_3\,(x - \theta_4)\right]} \tag{5}$$

em que $\boldsymbol{\theta} = (\theta_1, \theta_2, \theta_3, \theta_4)^\top$ é o vetor de parâmetros. O livro não apresenta a interpretação dos parâmetros, entretanto na obra de Pinheiro and Bates (2000) é possível encontrar o significado de cada parâmetro, dado por:

- θ_1: a assíntota horizontal quando $x \to \infty$;
- θ_2: a assíntota horizontal quando $x \to -\infty$;
- θ_3: o valor de x no ponto de inflexão. Neste valor de x a variável resposta esta no meio da assíntota;
- θ_4: parâmetro de escala

É importante lembrar que o principal intuito do estudo é comparar as curvas ajustadas no mês de Maio e Junho, afim de verificar se os dois soros contem o mesmo constituinte eficaz, conforme os termos técnicos queremos avaliar a hipótese de paralelismo entre as curvas. Dessa forma, a seguinte hipótese estatística deve ser avaliada:

$$\begin{cases} \mathcal{H}_0 : \boldsymbol{\theta}^{\text{May}} = \boldsymbol{\theta}^{\text{June}} \\ \mathcal{H}_1 : \boldsymbol{\theta}^{\text{May}} \neq \boldsymbol{\theta}^{\text{June}} \end{cases} \tag{6}$$

sendo que $\boldsymbol{\theta}^{\text{May}}$ e $\boldsymbol{\theta}^{\text{June}}$ denotam o vetor de parâmetros $\boldsymbol{\theta} = (\theta_1, \theta_2, \theta_3)^\top$ do mês de Maio e Junho, respectivamente. Note que o parâmetro de escala θ_4 não foi considerado pelos autores para comparar as curvas.

A suposição de paralelismo entre as curvas é importante, pois os autores também estão interessados na quantidade $\rho = g(\boldsymbol{\theta}) = 10^{-(\theta_4^{\text{May}} - \theta_4^{\text{June}})}$. Esta quantidade é função dos parâmetros e quantifica a potência do soro tomada em Junho em relação ao soro tomado em Maio. Portanto, se $\rho = 1$ temos evidências amostrais que não existe potência de um soro relativo a outro soro. Em termos estatísticos a hipótese a ser avaliada é expressa por:

$$\begin{cases} \mathcal{H}_0 : \rho = 1 \\ \mathcal{H}_1 : \rho \neq 1 \end{cases} \tag{7}$$

Para testar as hipótese especificadas em (6) e (7) os testes da razão de verossimilhança e Wald serão utilizados. A estatística destes testes são definidas, respectivamente, por:

$$S_{LR} = 2\left(\ell_c - \ell_r\right) \tag{8}$$

e

$$S_W = \left(\widehat{\boldsymbol{\theta}} - \boldsymbol{\theta}_0\right)^T \boldsymbol{I}(\widehat{\boldsymbol{\theta}}) \left(\widehat{\boldsymbol{\theta}} - \boldsymbol{\theta}_0\right) \tag{9}$$

em que ℓ_r e ℓ_c são os valores das funções de log-verossimilhanças avaliadas sob hipótese nula e alternativa, respectivamente, e $\boldsymbol{I}(\widehat{\boldsymbol{\theta}})$ denota a matriz de informação esperada localmente nas estimativas de máxima verossimilhança. Sob a hipótese nula, ambos os testes tem distribuição assintótica qui-quadrado com p graus de liberdade, sendo p o número de restrições impostas.

Note que estes testes e toda inferência realizada sob os parâmetros do modelo (2) assumem que o mesmo possui uma linearidade local e que as estimativas dos parâmetros são normalmente distribuídas. Na prática essas suposições podem não ser satisfeita, principalmente para pequenas amostras, uma alternativa é o uso de técnicas não paramétricas de reamostragem, tais como o Bootstrap e Jacknife (Efron, 1982). Neste trabalho a função `nlsBoot` da biblioteca nlstools (Baty et al., 2015) foi utilizada como alternativa a inferência clássica.

As análises foram conduzidas nos softwares SAS e R, usando os procedimentos `PROC NLIN` (SAS, 2010a) e `PROC NLMIXED` (SAS, 2010b) no SAS, já no R a função `nls` e a biblioteca nlstools, como mencionado anteriormente, foram utilizadas.

3 Resultados

Nesta seção serão apresentados os resultados relacionados a análise do dados descritos na seção anterior, os mesmo resultados estão nas seções 1.4.3 e 2.4.3 do livro de Huet et al. (2004). Utilizando o método da máxima verossimilhança estimamos os parâmetros do modelo (5) para os meses de Maio e Junho. Pelas propriedades assintótica dos EMV's foi possível mensurar a precisão das estimativas, além disso, foi computado também os intervalos de confiança Bootstrap, estes resultados estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Estimativas dos parâmetros, erro padrão assintótico e intervalos de confiança.

			Assintótico		Bootstrap	
Parâmetro	Estimativa	EP	LI	LS	LI	LS
θ_1^{May}	0.0424	0.0215	-0.0014	0.0862	0.0020	0.0770
θ_2^{May}	1.9367	0.0133	1.9096	1.9637	1.9117	1.9613
θ_3^{May}	2.5649	0.0971	2.3672	2.7627	2.3975	2.7522
θ_4^{May}	3.4672	0.0158	3.4350	3.4994	3.4384	3.4961
θ_1^{June}	0.0581	0.0164	0.0247	0.0914	0.0240	0.0882
θ_2^{June}	1.9088	0.0137	1.8809	1.9368	1.8809	1.9360
θ_3^{June}	2.8365	0.1059	2.6208	3.0522	2.6412	3.0283
θ_4^{June}	3.2507	0.0136	3.2230	3.2785	3.2253	3.2781

Observando o intervalo de confiança assintótico para o parâmetro θ_1^{May} nota-se que o mesmo contém o valor zero. Por outro lado, o intervalo Bootstrap apresentou menor amplitude e mostrou que o parâmetro é diferente de zero. Os outros parâmetros foram todos diferentes de zero e positivos e os intervalos de confiança assintóticos e Bootstrap apresentaram resultados similares. As curvas ajustadas estão apresentadas na Figura 2. Pode-se notar que a densidade óptica é maior no mês de Maio do que no mês de Junho.

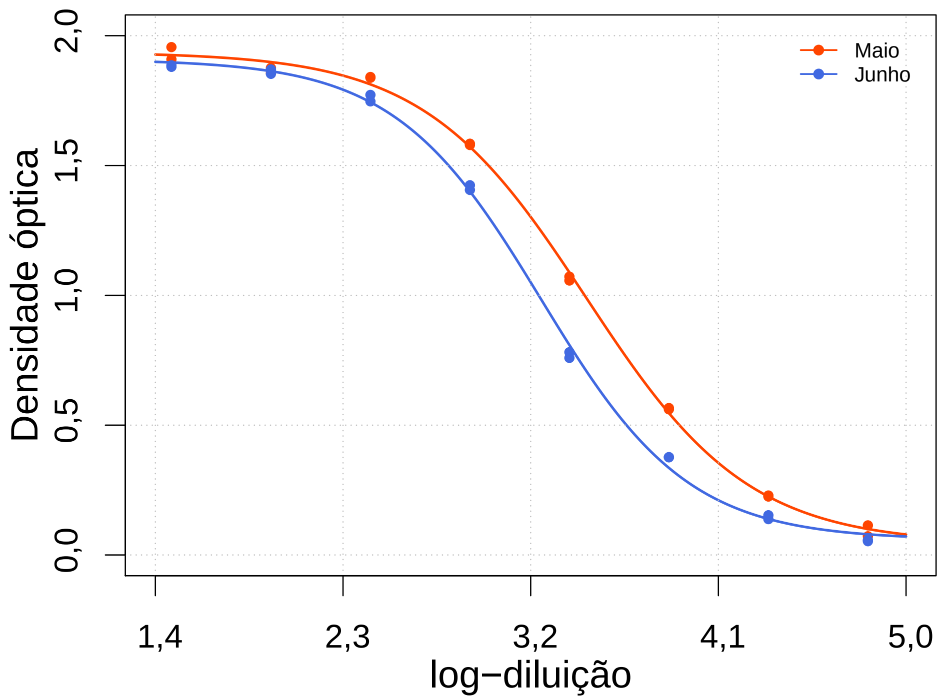

Figura 2: Curvas ajustadas conforme o mês de Maio e Junho.

Com finalidades de comparação gráfica entre os dois meses foi sobreposto as curvas ajustadas com suas respectivas bandas de confiança e os valores observados na Figura 3.

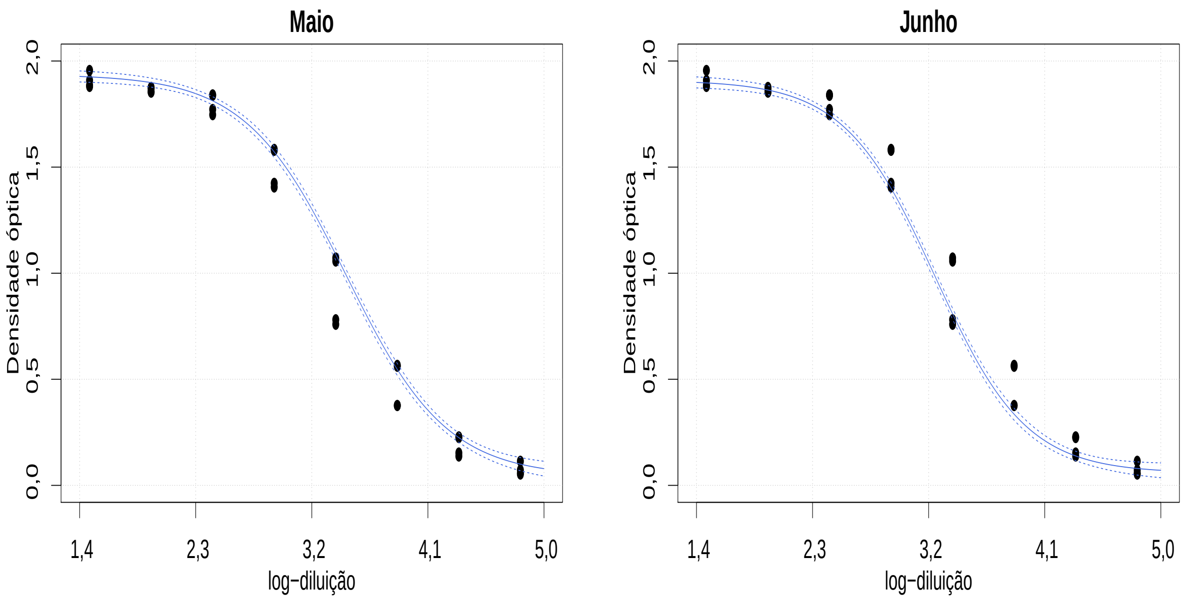

Figura 3: Curvas ajustadas e bandas de confiança conforme o mês de Maio e Junho.

Para testar a hipótese definida em (6) vamos utilizar os testes da razão de verossimilhanças (8) e Wald (9). Ressalta-se que caso haja evidências amostrais para rejeição da hipótese nula, pode-se concluir que as curvas do mês de Maio e Junho são estatisticamente diferentes. Os comandos utilizados tanto no SAS quanto no R estão disponíveis no Apêndice, além disso os resultados estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados dos testes para a hipótese (6).

Teste	GL	Estatística	valor-p
S_W	3	4.6866	0.1962
S_{LR}	3	4.4389	0.2178

Assim, com base na amostra selecionada podemos inferir que ambas as curvas são estatisticamente iguais, uma vez que em ambos os testes não encontramos evidência para rejeitar a hipótese nula (6).

Como discutido na metodologia deste trabalho os autores tiveram o interesse em estimar a seguinte função dos parâmetros $\rho = g(\boldsymbol{\theta}) = 10^{-(\theta_4^{\text{May}} - \theta_4^{\text{June}})}$. Sob o ponto de vista de inferência clássica ρ é estimado utilizando a propriedade de invariância dos estimadores de máxima verossimilhança. Portanto, a estimativa pontual da potência ρ do soro tomada em junho em relação ao soro tomado em maio é $\widehat{\rho} = 10^{-(3.4672 - 3.2507)} = 0.6075$.

Afim de testar a significância estatística de $\widehat{\rho}$ os autores testaram, sob um diferente ponto de vista, a hipótese nula definida em (7). Note que testar a hipótese (7) é equivalente a testar $\mathcal{H}_0 : \beta = 0$ versus $\mathcal{H}_1 : \beta \neq 0$, em que $\beta = \theta_4^{\text{May}} - \theta_4^{\text{June}}$. Assim, ao invés de testar se $\rho = 0$ os autores realizaram o teste sobre β. Considerando a estatística da razão de verossimilhanças obtemos que $S_{LR} = 47,3401$ e o valor-$p < 0,000$. Logo, podemos concluir que ρ é estatisticamente significativo. Vale pontuar que os códigos utilizados para testar determinada hipótese encontram-se no Apêndice deste trabalho.

Por fim, os autores também calculam o intervalo de confiança assintótico (Wald) e Bootstrap para o parâmetro ρ. Foi considerado $B = 1000$ amostras, na Tabela 3 é apresentado os resultados de ambos intervalos de confiança.

Tabela 3: Intervalos de 95% de confiança assintótico e Bootstrap para o parâmetro ρ.

	Limites		
Método	Inferior	Superior	Amplitude
Assintótico	0.5503	0.6647	0.1144
Bootstrap	0.5543	0.6634	0.1091

A distribuição empírica Bootstrap de ρ é apresentada na Figura 4. A linha tracejada em vermelho indica a estimativa pontual de ρ, já as linhas em preto representam o intervalo de 95% de confiança baseado nas B amostras Bootstrap.

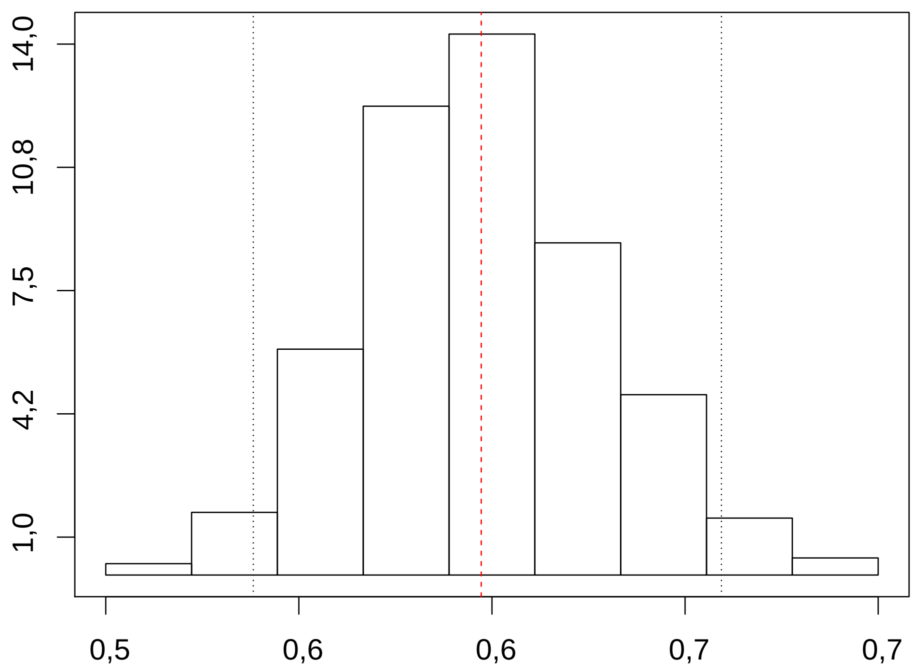

Figura 4: Distribuição empírica Bootstrap de ρ.

Observa-se que o intervalo Bootstrap obteve uma amplitude um pouco menor que o intervalo assintótico. Do ponto de visto prático não há diferenças consideráveis aos métodos.

4 Considerações finais

O presente trabalho refez a análise dos dados referentes a seção 1.1.3 do livroHuet et al. (2004). Os mesmos resultados encontrados nas seções 1.4.3 e 2.4.3 estão apresentados neste texto. As análises foram desenvolvidas em ambos os softwares R e SAS e os códigos estão disponíveis no Apêndice.

O principal objetivo da análise era comparar os níveis de anticorpos em duas amostras de soro colhidas em Maio e Junho. Assim, foi considerado o modelo logístico com quatro parâmetros (Pinheiro and Bates, 2000) e realizado testes sobre os parâmetros dos modelos. Os resultados indicaram que as curvas possuem um comportamento de paralelismo, dessa forma foi possível estimar a diferença, $\beta = \theta_4^{\text{May}} - \theta_4^{\text{June}}$, a qual foi de 0.223. Na sequência, foi obtido estimativas pontuais e intervalares de ρ, e conclui-se que a potência do soro tomada em Junho em relação ao soro tomado em Maio é 0.6075, sendo seu intervalo assintótico de 95% de confiança dado por $(0.5503, 0.6647)$.

Referências

Baty, F., Ritz, C., Charles, S., Brutsche, M., Flandrois, J.-P., Delignette-Muller, M.-L., 2015. A toolbox for nonlinear regression in R: The package nlstools. Journal of Statistical Software 66 (5), 1–21.

Efron, B., 1982. The Jackknife, the Bootstrap and other resampling plans. Vol. 38. SIAM.

Huet, S., Bouvier, A., Poursat, M.-A., Jolivet, E., 2004. Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples. Springer.

Lehmann, E. J., Casella, G., 1998. Theory of Point Estimation. Springer Verlag.

Pawitan, Y., 2001. In All Likelihood: Statistical Modelling and Inference Using Likelihood. Oxford University Press, Oxford.

Pinheiro, J. C., Bates, D. M., 2000. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. Springer.

SAS, 2010a. The NLIN Procedure, SAS/STAT® User's Guide, Version 9.4. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SAS, 2010b. The NLMIXED Procedure, SAS/STAT® User's Guide, Version 9.4. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Apêndice

Todos os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos utilizando os softwares R e SAS. Neste apêndice exibimos os códigos utilizados em ambos softwares.

Código 1: Códigos utilizados no R

```
##------------------------------------------------------------------
rm(list = ls())
library(nlstools)

# Conjunto de dados ---------------------------------------------
dilution <- rep(c(rep(30,2), rep(90,2), rep(270,2), rep(810,2), rep(2430,2), rep(7290,2), rep(21869,2), rep(65609,2)), 2)
elisa <- data.frame(logd=log10(dilution),
OD = c(1.909, 1.956, 1.856, 1.876, 1.838, 1.841, 1.579,
1.584, 1.057, 1.072, 0.566, 0.561, 0.225, 0.229,
0.072, 0.114, 1.886, 1.880, 1.853, 1.870, 1.747,
1.772, 1.424, 1.406, 0.781, 0.759, 0.377, 0.376,
0.153, 0.138, 0.053, 0.058),
month = c(rep("may", 16), rep("june", 16)))
elisa$month <- factor(elisa$month)
elisa$month <- relevel(elisa$month, 'may')

# Ajuste do modelo ----------------------------------------------
mod.c <- OD ~ theta1[month] + (theta2[month] - theta1[month]) / (1 + exp(theta3[month] * (logd - theta4[month])))
ini.c <- list(theta1 = c(0.05, 0.05), theta2 = c(1.9, 1.9), theta3 = c(2.5, 2.5), theta4 = c(3.2, 3.2))
elisa.c <- nls(formula = mod.c, data = elisa, start = ini.c)
summary(elisa.c)

# Ajuste separado e IC bootstrap -------------------------------
elisa.may  <- nls(formula = mod.r, data = subset(elisa, month == 'may'), start = ini.r)
summary(elisa.may)
elisa.june <- nls(formula = mod.r, data = subset(elisa, month == 'june'), start = ini.r)
summary(elisa.june)

boot.may  <- nlsBoot(elisa.may)
boot.june <- nlsBoot(elisa.june)

est <- rbind(tidy(elisa.may), tidy(elisa.june))[, -c(4, 5)]
icb <- rbind(boot.may$bootCI, boot.june$bootCI)[, -1]
fim <- cbind(est, icb)
print(xtable(fim, digits = 4))



# Grafico com as curvas ajustadas -------------------------------
fx <- function(x, theta)
{
  theta1 <- theta[1]; theta2 <- theta[2]; theta3 <- theta[3]; theta4 <- theta[4]
  theta1 + (theta2 - theta1) / (1 + exp(theta3 * (x - theta4)))
}
x          <- seq(1.4, 5, l = 1000)
theta.may  <- coef(elisa.may)
theta.june <- coef(elisa.june)
fx.may     <- fx(x, theta.may)
fx.june    <- fx(x, theta.june)
```

```
plot(OD ~ logd, col = c('royalblue', 'orangered')[month], data = elisa, pch = 19, xlim = c(1.4, 5), ylim = c(0, 2), cex = 0.6)
lines(fx.may ~ x, lwd = 2, col = 'orangered')
lines(fx.june ~ x, lwd = 2, col = 'royalblue')
abline(h=seq(0, 2, l = 5), v=seq(1.4, 5, l = 5), col = 'gray', lty = 'dotted')
legend('topright', legend = c('Maio', 'Junho'),
       col = c('orangered', 'royalblue'), lwd = 1.4, pch = 19, bty = 'n', inset = 0.02, cex = 0.6)

# Testando a hipotese (6) ---------------------------------------
modH0 <- OD ~ theta1 + (theta2  - theta1)/(1 + exp(theta3 * (logd - theta4[month])))
modH1 <- OD ~ theta1[month] + (theta2[month] - theta1[month])/(1 + exp(theta3[month] * (logd - theta4[month])))

fitH0 <- nls(modH0, data = elisa, start = list(theta1 = 0.05, theta2 = 1.9, theta3 = 2.5, theta4 = c(3.2, 3.2)))
fitH1 <- nls(modH1, data = elisa, start = list(theta1 = c(0.05, 0.05), theta2 = c(1.9, 1.9), theta3 = c(2.5, 2.5), theta4 = c(3.2, 3.2)))

anova(fitH0, fitH1)
ll_H0 <- as.numeric(logLik(fitH0))
ll_H1 <- as.numeric(logLik(fitH1))
S_LR  <- 2 * (ll_H1 - ll_H0)
c(S_LR, pchisq(S_LR, df = 3, lower.tail = F))

theta_hat <- diff(coef(fitH1)[-c(7, 8)])[-c(2, 4)]
I_may     <- vcov(fitH1)[c('theta11', 'theta21', 'theta31'), c('theta11', 'theta21', 'theta31')]
I_june    <- vcov(fitH1)[c('theta12', 'theta22', 'theta32'), c('theta12', 'theta22', 'theta32')]
I_hat     <- I_may + I_june
S_W       <- theta_hat %*% solve(I_hat) %*% theta_hat
c(S_W, pchisq(S_W, df = 3, lower.tail = F))

# Intervalo de confianca Bootstrap para rho ---------------------
rho <- function(theta4_may, theta4_june){
  10^(-(theta4_may - theta4_june))
}
rho.hat   <- rho(coef(elisa.c)['theta41'], coef(elisa.c)['theta42'])
set.seed(1212)
B                <- 1000
boot.may         <- nlsBoot(nls = elisa.may,  niter = B)
boot.june        <- nlsBoot(nls = elisa.june, niter = B)
theta4.may.boot  <- boot.may$coefboot[, 4]
theta4.june.boot <- boot.june$coefboot[, 4]


rho.boot         <- ldply(lapply(1:B, function(i) rho(theta4.may.boot[i], theta4.june.boot[i])))$V1
quantile(rho.boot, c(0.025, 0.975), na.rm = T)
```

Código 2: Códigos utilizados no SAS

```
/* Importando dados */
proc import out = elisa replace
        datafile = '...\elisa.txt'
        dbms = tab;
        getnames = yes;
run;

/*Ajuste do modelo usando a PROC NLIMIXED*/
proc nlmixed data = elisa df = 999999 tech = quanew cov;
        parms theta1_may  = 0.05, theta2_may  = 1.9, theta3_may  = 2.5, theta4_may  =
            3.2, theta1_june = 0.05, theta2_june = 1.9, theta3_june = 2.5, theta4_june =
            3.2, sigma = 1;
        bounds sigma > 0;
        if(month = 'may') then do;
        mean = theta1_may + (theta2_may - theta1_may) / (1 + exp(theta3_may * (logd -
            theta4_may)));
        end; else do;
        mean = theta1_june + (theta2_june - theta1_june) / (1 + exp(theta3_june * (logd -
             theta4_june)));
        end;
        ll = - 0.5 * log(2*constant("pi")) - 0.5 * log(sigma**2) - 0.5 / sigma**2 * (od -
             mean)**2;
        model od ~ general(ll);
        estimate 'beta' theta4_may - theta4_june;
        estimate 'rho'  10**(-(theta4_may - theta4_june));
        predict mean out = media;
run;

/*Ajuste do modelo usando a PROC NLIN*/
proc nlin data = elisa tech = quanew;
        parms theta1_may  = 0.05, theta2_may  = 1.9, theta3_may  = 2.5, theta4_may  =
            3.2,
        theta1_june = 0.05, theta2_june = 1.9, theta3_june = 2.5, theta4_june = 3.2;
        if(month = 'may') then do;
        mean = theta1_may + (theta2_may - theta1_may) / (1 + exp(theta3_may * (logd -
            theta4_may)));
        end; else do;
        mean = theta1_june + (theta2_june - theta1_june) / (1 + exp(theta3_june * (logd -
             theta4_june)));
        end;
        model od = mean;
run;

/*Testando a hipotese ->  H_0: theta_may = theta_june vs. H_1: theta_may =! theta_june*/

* Modelo completo;
proc nlmixed data = elisa df=99999 tech = quanew;
        parms theta1_may  = 0.05, theta2_may  = 1.9, theta3_may  = 2.5, theta4_may  =
            3.2,
        theta1_june = 0.05, theta2_june = 1.9, theta3_june = 2.5, theta4_june = 3.2,
            sigma = 1;
        bounds sigma > 0;
        if(month = 'may') then do;
        mean = theta1_may + (theta2_may - theta1_may) / (1 + exp(theta3_may * (logd -
            theta4_may)));
        end; else do;
        mean = theta1_june + (theta2_june - theta1_june) / (1 + exp(theta3_june * (logd -
             theta4_june)));
```

```
        end;
        ll = - 0.5 * log(2*constant("pi")) - 0.5 * log(sigma**2) - 0.5 / sigma**2 * (od - mean)**2;
        model od ~ general(ll);
        contrast 'theta_may␣=␣theta_june' theta1_may - theta1_june, theta2_may - theta2_june, theta3_may - theta3_june;
        ods output Contrasts = Wald(drop = label DenDF rename = (NumDF = df FValue = est ProbF = pvalue));
        ods output FitStatistics = H1(rename = (value = llh1 ) where = (descr = '-2␣Log␣Likelihood'));
quit;

* Modelo restrito;
proc nlmixed data = elisa df=99999 tech = quanew;
        parms theta1  = 0.05, theta2  = 1.9, theta3  = 2.5, theta4_may  = 3.2, theta4_june = 3.2, sigma = 1;
        bounds sigma >0;
        if(month = 'may') then do;
        mean = theta1 + (theta2 - theta1) / (1 + exp(theta3 * (logd - theta4_may)));
        end; else do;
        mean = theta1 + (theta2 - theta1) / (1 + exp(theta3 * (logd - theta4_june)));
        end;
        ll = - 0.5 * log(2*constant("pi")) - 0.5 * log(sigma**2) - 0.5 / sigma**2 * (od - mean)**2;
        model od ~ general(ll);
        ods output FitStatistics = H0(rename = (value = llh0 ) where = (descr = '-2␣Log␣Likelihood'));
run;

* Ajuste dos resultados;
data LR(drop = Descr llH0 llH1);
   merge H0 H1;
   df          = 3;
   Est         = llH0 - llH1;
   pvalue      = 1 - cdf('CHISQUARE', Est, df);
run;

data wald;
   set wald;
   est = df * est;
run;

data testes;
    set Wald LR;
run;

* Exibindo resultados;
proc print data = testes noobs;
    format _numeric_ comma10.4;
run;
```