

Condensato dell'aria espirata (EBC): applicazioni cliniche

Exhaled breath condensate: clinical applications

Salvatore Fuschillo¹, Claudio Candia², Silvestro Ennio D'Anna¹,
Carmen Lombardi¹, Claudia Merola¹, Antonio Iovine², Marco Filippelli²,
Pasquale Ambrosino³, Mauro Maniscalco^{1,2}

¹ Istituti Clinici Scientifici Maugeri IRCCS, Unità Operativa di Riabilitazione Respiratoria, Telese Terme (BN); ² Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; ³ Istituti Clinici Scientifici Maugeri IRCCS, Direzione Scientifica dell'Istituto di Telese Terme, Telese Terme (BN)

Riassunto

Le vie aeree sono ricoperte da un sottile strato di liquido noto come liquido di superficie delle vie aeree (ALF), costituito da una miscela complessa di proteine, peptidi, lipidi, elettroliti ed acqua. Il condensato dell'aria espirata (EBC) rappresenta una matrice biologica estremamente valida per lo studio dell'ALF.

L'EBC è ottenuto dal respiro orale attraverso un boccaglio con una valvola unidirezionale che devia il flusso dell'aria all'interno di una camera refrigerante. L'aria espirata satura di vapore acqueo e le particelle aerosolizzate dell'ALF condensano sulla superficie della camera e il liquido condensato può essere così raccolto.

L'EBC comprende oltre 2.000 composti e molti possono essere utilizzati come *marker* indicati per valutazione dell'infiammazione delle vie aeree, *screening* e diagnostica precoce, valutazione dell'esposizione ambientale e professionale, monitoraggio farmacologico, fisiologia dell'esercizio.

Parole chiave: biomarker, BPCO, asma, riabilitazione, metabolomica

Summary

Airways are covered by a thin layer of fluid known as airway lining fluid (ALF), which is made up of a complex mixture of proteins, peptides, lipids, electrolytes, and water. Exhaled breath condensate (EBC) represents an extremely valid biological matrix for the study of ALF. EBC is obtained by oral breathing through a mouthpiece equipped with a saliva trap and a one-way valve that diverts the flow of air through a tube into a cooling chamber. The exhaled air saturated with water vapor and the aerosolized ALF particles condense on the surface of the chamber so that the condensed liquid can be collected. EBC includes over 2,000 compounds and several biomarkers indicated for the evaluation of airway inflammation, screening and early diagnosis, evaluation of environmental and professional exposure, pharmacological monitoring, exercise physiology.

Key words: biomarker, COPD, asthma, rehabilitation, metabolomics

Introduzione

Le vie aeree sono ricoperte da un sottile strato di liquido noto come liquido del *lining* (superficie) delle vie aeree (ALF), costituito da una miscela complessa di proteine, peptidi, lipidi, elettroliti ed acqua ¹. L'ALF ha un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi polmonare svolgendo un'azione immunomodulante, di promozione della riparazione del danno tessutale e di trasporto di vari nutrienti.

L'epitelio alveolare secreta un liquido ricco di lipidi e proteine noto come surfattante che regola ed ottimizza la meccanica polmonare ².

Ricevuto/Received: 04/04/2024
Accettato/Accepted: 05/04/2024

Corrispondenza

Mauro Maniscalco
Istituti Clinici Scientifici Maugeri IRCCS, via
Maugeri 4, 27100, Pavia
mauro.maniscalco@icsmaugeri.it

Conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non avere nessun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.

Come citare questo articolo: Fuschillo S, Candia C, D'Anna SE, et al. Condensato dell'aria espirata (EBC): applicazioni cliniche. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio 2024;39:51-56. <https://doi.org/10.36166/2531-4920-744>

© Copyright by Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri – Italian Thoracic Society (AIPO-ITS/ETS)



OPEN ACCESS

L'articolo è open access e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

Essendo una matrice prossima alle vie aeree, l'ALF va incontro a modificazioni qualitative e quantitative della sua composizione in caso di patologie respiratorie, in seguito alla esposizione ad inquinanti professionali e anche nel corso di alcune patologie sistemiche.

La metodica più idonea per il campionamento dell'ALF è attualmente il lavaggio bronco-alveolare (BAL) ³. Tuttavia, l'invasività della procedura endoscopica necessaria per effettuare il BAL ne ostacola fortemente l'utilizzo nella pratica clinica quotidiana sia come strumento diagnostico, sia come strumento di monitoraggio clinico. Un metodo non invasivo per ottenere informazioni indirette sulla composizione dell'ALF è quello di raccogliere il condensato dell'aria espirata (EBC). La raccolta e lo studio dell'EBC presenta numerosi vantaggi rispetto al BAL. Infatti, la metodica non è invasiva e può essere pertanto eseguita in tutti i soggetti, indipendentemente dall'età, e in tutte le malattie respiratorie indipendentemente dalla loro gravità e finanche nei pazienti in ventilazione meccanica. Inoltre, l'EBC offre l'opportunità di effettuare misurazioni seriate nella stessa persona sia in fase stabile che durante le fasi di riacutizzazione della malattia, fornendo informazioni preziose per la valutazione e il monitoraggio fisiopatologico delle vie aeree ⁴. L'EBC è costituito principalmente da acqua distillata, particelle aerosolizzate dall'ALF, a causa del flusso turbolento dell'espirato attraverso le vie aeree, e sostanze volatili idro-solubili. Nell'EBC sono stati identificati più di 2.000 composti ⁵ e molti di essi sono potenziali bio-

marcatori di malattie polmonari. Inoltre, l'EBC, essendo ottenuto direttamente dalle vie aeree, è una matrice biologica più rilevante rispetto ad altre per lo studio delle patologie polmonari ⁶.

L'EBC contiene sia composti organici che inorganici, tra cui ricordiamo perossido di idrogeno (H₂O₂), ossido nitrico (NO), mediatori lipidici (8-isprostano, leucotrieni e prostaglandine), piccole proteine (citochine e chemochine) e derivati di acidi nucleici ⁷ (Tab. I). Questi biomarcatori possono essere alterati in varie malattie polmonari come asma bronchiale, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), bronchiectasie, infezioni e neoplasie polmonari. Lo studio di questi biomarcatori può quindi riflettere il grado e il tipo di infiammazione polmonare nel corso delle differenti malattie respiratorie ⁸.

Come funziona?

L'EBC può essere facilmente ottenuto in quasi tutte le circostanze, indipendentemente dalle caratteristiche del soggetto, dalla gravità della patologia polmonare, nel soggetto in respiro spontaneo o in ventilazione meccanica.

Dopo aver posizionato una clip nasale, si invita il soggetto a respirare tranquillamente attraverso un boccalino provvisto di trappola salivare e di una valvola unidirezionale che devia il flusso dell'aria espirata attraverso un tubo di Teflon, polipropilene o altro materiale inerte, all'interno di una camera refrigerante. L'aria espirata satura di vapore acqueo e le particelle aerosolizzate

Tabella I. Principali biomarcatori presenti nell'EBC.

pH	Biomarcatore validato e riproducibile. Valori ridotti di pH sono stati riscontrati in varie patologie polmonari tra cui asma e BPCO. Valori particolarmente ridotti sono stati riscontrati in soggetti con asma riacutizzato e in un sottogruppo specifico di pazienti con BPCO. Il trattamento con corticosteroidi determina un aumento dei valori del pH nel soggetto asmatico. Il reflusso gastroesofageo acidifica le vie aeree.
Metaboliti dell'acido arachidonico	Comprende leucotrieni, lipoxine, isoprostani e prostanoidi implicati nel controllo della risposta infiammatoria e di altre vie metaboliche.
Biomarker dello stress ossidativo	H ₂ O ₂ , isoprostani, prodotti della ossidazione del DNA e dell'RNA, prodotti della ossidazione di peptidi, lipidi, glutazione.
Citochine e chemochine	Molecole con azione pro- e anti-infiammatoria. Rappresentano biomarcatori di infiammazione cronica. Nell'EBC è stata individuata una numerosa serie di citochine e chemochine tra cui ricordiamo TNF, INF, IL-1beta, RANTES e vari membri della famiglia di interleuchine (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6; IL-8, IL-10, IL-13, IL-18).
Proteine e metaboliti	L'analisi proteomica dell'EBC consente la individuazione di specifiche proteine quali biomarcatori di infiammazione e di stress ossidativo. La significativa e differente espressione di queste proteine nell'EBC può rappresentare un potenziale <i>biomarker</i> per la precoce identificazione di patologie polmonari, <i>in primis</i> le patologie neoplastiche.
Derivati dall'ossido nitrico	Nitrati e nitriti sono derivati dell'ossido nitrico che possono combinarsi con l'ossigeno a formare nitroderivati altamente reattivi (RNS) che interagendo con i gruppi tiolici di varie biomolecole formano S-nitrosotioili e interagendo con la tirosina formano 3-nitrotirosina.
Acidi nucleici	Possono essere determinabili nell'EBC con la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR).

dell'ASF condensano sulla superficie della camera refrigerante e il liquido condensato può essere poi raccolto. Generalmente, la durata della procedura è di circa 10 minuti sia negli adulti che nei bambini di età superiore ai 4 anni; tale durata è ben tollerata dalla maggior parte dei soggetti e fornisce un volume di condensato di circa 1-3 ml, sufficiente per le successive analisi ⁹.

Qual è lo stato dell'arte?

Lo studio dell'EBC attraverso diverse metodiche (Tab. II) si presta a svariate applicazioni sia come metodica di ricerca che come indagine da implementare nella pratica clinica. Numerosi sono gli obiettivi che possono essere raggiunti dall'analisi dei composti presenti nell'EBC:

- **Identificazione e monitoraggio di biomarcatori:** l'EBC contiene citochine, leucotrieni e marcatori dello stress ossidativo e nitrosativo. L'analisi delle sostanze presenti nell'EBC ottenuto da soggetti con varie patologie quali asma, BPCO e malattie polmonari interstiziali ha la potenzialità di identificare biomarcatori o profili di biomarcatori specifici per le singole patologie. In aggiunta, il monitoraggio delle variazioni nel breve e lungo tempo di questi biomarcatori può fornire informazioni preziose sulla progressione della malattia e sulla risposta al trattamento nel singolo paziente.

Per esempio, le concentrazioni di leucotriene (LT) B₄, LTC₄, LTE₄, interleuchina(IL)-4, 8-isoprostano sono aumentati nell'asma rispetto ai soggetti sani. Analogamente, LTB₄, prostaglandina (PG) E₂, PG-F₂α, 8-isoprostano sono aumentati nella BPCO rispetto ai soggetti sani. Altri marcatori quali IL-4, IL-5 e IL-13 hanno la potenzialità di discriminare tra soggetti con asma e quelli con BPCO ⁸.

Maniscalco et al. attraverso l'analisi metabolomica dell'EBC con risonanza magnetica nucleare (NMR) hanno discriminato con buona sensibilità e specificità i pazienti asmatici da quelli con BPCO, dimostrando che i livelli di etanolo e di metanolo erano

più elevati in maniera statisticamente significativa nei soggetti con BPCO rispetto a quelli con asma, mentre i valori di formato e acetone/acetoina erano significativamente inferiori ¹⁰.

Analogamente, in un altro studio dello stesso gruppo, l'analisi metabolomica dell'EBC ha consentito di identificare un set di biomarcatori in grado di separare asmatici obesi, asmatici magri e obesi non asmatici ¹¹.

Infine, l'8-isoprostano rappresenta un prodotto dello stress ossidativo ed è aumentato in varie patologie infiammatorie, fra cui l'asma bronchiale. Dopo appropriato trattamento i livelli dell'8-isoprostano nell'EBC gradualmente si riducono rendendolo un potenziale *marker* utile per il monitoraggio terapeutico nei bambini affetti da asma bronchiale ¹².

- **Valutazione dell'infiammazione delle vie aeree:** lo studio dei mediatori della risposta infiammatoria quali citochine e leucotrieni presenti nell'EBC consente di ottenere informazioni sia sul tipo di risposta infiammatoria (Th2 vs Th1) che sulla sua gravità ¹³. Inoltre, tali informazioni sono rilevanti per comprendere i meccanismi fisiopatologici attivi nelle varie malattie polmonari e per supportare i clinici nella implementazione di un trattamento personalizzato. Alcuni biomarcatori, in primis l'H₂O₂, hanno il potenziale di essere utilizzati come *marker* per il monitoraggio dell'infiammazione essendo l'incremento della loro concentrazione nell'EBC correlata all'aumentato numero ed attività di cellule infiammatorie ⁸.
- **Diagnosi precoce e screening in soggetti a rischio malattia:** la diagnosi precoce delle malattie polmonari croniche è fondamentale per un tempestivo e idoneo trattamento evitando, o quantomeno rallentando, il realizzarsi di quei rimodellamenti strutturali dell'organo dovuti all'infiammazione cronica. Una diagnosi precoce è inoltre uno step imprescindibile per ottenere un miglioramento della prognosi nei pazienti neoplastici.

La presenza e/o la variazione di specifici biomarcatori considerati singolarmente o il profilo di più biomarcatori considerati contemporaneamente ha la potenzialità di individuare i soggetti ad alto rischio di sviluppare una malattia o diagnosticarla prima della comparsa dei sintomi clinici. Ad esempio, i livelli di acido 5-idrossieicosatetraenoico (HETE) nell'EBC risultano aumentati nei pazienti con tumore polmonare rispetto ai soggetti sani ¹⁴. Chen e collaboratori ¹⁵ hanno recentemente riportato che la determinazione nell'EBC dei livelli del fattore di crescita epidermico (EGF) può avere un ruolo rilevante nella diagnosi, nel monitoraggio e nella definizione pro-

Tabella II. Principali metodiche analitiche applicate allo studio dell'EBC.

Spettrometria di massa (MS)
Risonanza magnetica nucleare (NMR)
Dosaggio immunoenzimatico (ELISA)
Gasromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)
Cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS)
Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)
Multiplex immunodosaggi
Dosaggio radioimmunologico (RIA)

agnostica nei pazienti con NSCLC. Lo stesso gruppo di ricercatori, in un precedente studio, aveva inoltre riportato che il dosaggio del miRNA let-7 nell'EBC può aver un ruolo sia nella diagnosi che nella valutazione dei pazienti con NSCLC ¹⁶.

Inoltre, nei pazienti con eteroplasia polmonare l'analisi dell'EBC può consentire la identificazione di alterazioni genetiche ed epigenetiche quali KRAS, EGFR e la instabilità dei microsatelliti ¹⁷.

- **Valutazione dell'esposizione ambientale e professionale:** l'esposizione ad inquinanti ambientali *indoor* e *outdoor* o l'esposizione ad inquinanti professionali può essere monitorata attraverso l'analisi dei composti presenti nell'EBC ¹⁸. Ad esempio, nell'EBC è possibile individuare la presenza di metalli, quali i derivati del cromo, in alcune attività professionali come i saldatori ¹⁹. In definitiva, gli ambienti professionali beneficiano del monitoraggio dell'EBC per valutare i rischi legati all'esposizione.
- **Monitoraggio farmacologico:** l'EBC fornisce un metodo non invasivo per valutare l'efficacia dei farmaci sull'infiammazione delle vie aeree e sullo stress ossidativo. Inoltre, il monitoraggio dei biomarcatori nell'EBC durante il trattamento può supportare un approccio terapeutico personalizzato ²⁰.
- **Fisiologia dell'esercizio e medicina dello sport:** l'esercizio fisico, specie se agonistico, comporta alterazioni a livello della mucosa delle vie aeree ed in alcuni soggetti causa broncocostrizione ed infiammazione (asma da sforzo). L'analisi dell'EBC negli atleti consente di valutare le alterazioni delle vie aeree indotte dallo sforzo fisico e potrebbe essere utile per ottimizzare e personalizzare i programmi di allenamento degli atleti ²¹.

Limiti dell'EBC

Prima che lo studio dell'EBC possa trovare la sua giusta collocazione sia come strumento di ricerca scientifica, sia come procedura diagnostica e di monitoraggio da implementare nella pratica clinica quotidiana, bisognerebbe superare una serie di importanti limitazioni, qui di seguito esposte.

- **Standardizzazione:** la composizione dell'EBC può variare a causa di diversi fattori quali il *pattern* respiratorio, l'umidità e la temperatura ambientale, gli stili di vita, etc. Standardizzare i protocolli di raccolta, processazione ed analisi del campione è di fondamentale importanza per ottenere dati attendibili e, soprattutto, confrontabili. I principali fattori che ostacolano l'applicazione dell'EBC nella pratica clinica sono l'assenza di standard metodologici e di valori di riferimento specifici per ciascun biomarcatore.

A tale proposito nel 2017 l'ATS/ERS ha pubblicato delle raccomandazioni sulla metodica di raccolta e sugli standard tecnici dell'analisi dell'EBC ²².

- **Effetto di diluizione:** il vapore acqueo dell'espirato diluisce fortemente i composti contenuti nell'EBC, e il fattore di diluizione deve essere tenuto in debita considerazione quando si analizzano i risultati. Il rapporto tra le concentrazioni dei composti non volatili presenti nell'EBC e quelli presenti nell'ALF è considerato come il fattore di diluizione dell'EBC ed è stato riportato avere una ampia variabilità compresa tra 1.000 e 50.000 ⁹.
Un fattore di diluizione ideale dovrebbe avere una concentrazione plasmatica nota e stabile nel tempo, un'elevata capacità di diffusione attraverso la membrana cellulare e, infine, non dovrebbe essere un prodotto del tratto respiratorio. Sfortunatamente al momento nessun fattore di diluizione universalmente accettato è stato identificato. Tuttavia, sono stati proposti vari indicatori di diluizione, come l'urea, le proteine totali, i cationi totali (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) e la conduttività dei campioni liofilizzati ed evaporati sotto vuoto ⁹.
- **Contaminanti e artefatti:** l'EBC può contenere contaminanti provenienti dalle vie aeree superiori (saliva, muco), dal tratto gastrointestinale (reflusso esofageo) o particelle ambientali che possono interferire sui risultati delle analisi e sulla loro interpretazione ²³.
- **Basse concentrazioni di biomarcatori:** la concentrazione di alcuni biomarcatori nell'EBC è molto bassa e, spesso, al di sotto del limite di risoluzione delle metodiche analitiche comunemente in uso. Tuttavia la disponibilità di metodiche analitiche altamente sensibili ha superato questo ostacolo e ha consentito la identificazione di un crescente numero di composti presenti nell'EBC.
- **Validazione:** i vari biomarcatori identificati nell'EBC in soggetti con varie patologie polmonari non sono stati pienamente validati per la diagnosi o per la valutazione della gravità della malattia. Affinché i biomarcatori identificati nell'EBC possano acquisire rilevanza clinica è necessario che essi vengano validati rispetto ai *gold standard*.
- **Variabilità interindividuale:** i composti presenti nell'EBC differiscono tra gli individui a causa dell'età, del sesso, dello stile di vita e dello stato di salute. L'elevata variabilità dei composti, legata anche all'effetto diluizione, rende l'interpretazione dei risultati complessa. È importante stabilire per ciascun composto intervalli di riferimento personalizzati.
- **Conservazione e stabilità:** i campioni di EBC si degradano nel tempo. Le condizioni di conservazi-

one (temperatura, contenitori) sono fondamentali per ottenere risultati attendibili. Inoltre, la stabilità a lungo termine deve essere ulteriormente indagata.

- **Accessibilità limitata:** le apparecchiature per l'analisi dei campioni di EBC non sono ampiamente disponibili negli ambienti clinici.

Prospettive future

L'EBC è una matrice facilmente disponibile e in grado di offrire un approccio non invasivo per lo studio della fisiopatologia polmonare. I numerosi composti identificati nell'EBC riflettono lo stato fisiopatologico polmonare ed è ipotizzabile che in un tempo non lontano esso potrà essere impiegato sia per supportare i clinici nella diagnosi e fenotipizzazione delle malattie respiratorie, sia per il monitoraggio delle loro riacutizzazioni, nonché per valutare l'effetto dei farmaci antiinfiammatori nei *trial* clinici.

Lo sviluppo delle cosiddette "scienze omiche" (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica, epigenomica, microbiomica e lipidomica) applicate all'analisi dell'EBC ha consentito significativi sviluppi nell'identificazione di numerosi potenziali biomarcatori in grado di favorire una più approfondita comprensione dei complessi meccanismi fisiopatologici coinvolti nelle patologie polmonari. Inoltre, la disponibilità di tecniche analitiche altamente sensibili ha permesso di ottenere una elevata quantità di dati sia qualitativi che quantitativi riguardo i numerosi biomarcatori presenti nell'EBC. Si spera che grazie all'utilizzo di algoritmi *machine learning* applicati ai dati ottenuti dallo studio dell'EBC, questo possa diventare uno strumento prezioso per identificare biomarcatori o *patterns* di biomarcatori associati con lo stato di salute o di malattia.

L'integrazione delle informazioni provenienti da più livelli omici, attraverso la costruzione di modelli predittivi per la precisa caratterizzazione dei pazienti, consentirà una maggiore comprensione della complessità fisiopatologica alla base delle patologie respiratorie. Tutto questo risulta particolarmente importante oggi che, grazie all'introduzione di farmaci biologici selettivi per specifiche vie metaboliche, abbiamo bisogno di biomarcatori in grado di riflettere in maniera specifica gli endotipi operanti in ciascuna malattia per la individuazione di una strategia terapeutica personalizzata. In aggiunta, prima che lo studio dell'EBC possa essere raccomandato nella pratica clinica sono necessari studi longitudinali per monitorare i cambiamenti dei suoi componenti nel lungo periodo.

Grazie agli sviluppi tecnologici è verosimile ipotizzare che, come è avvenuto per altre metodiche quali il FeNO e l'espettorato indotto, la corretta raccolta del campio-

ne e la precisa interpretazione dei dati analitici ottenuti dall'EBC consentiranno il trasferimento di tali conoscenze dal laboratorio di ricerca al letto del paziente in un approccio di biologia dei sistemi per la definizione della diagnosi fenotipica delle patologie respiratorie al fine di identificare bersagli terapeutici precisi.

Per la realizzazione di tali obiettivi sono necessarie elevate competenze professionali e *team* multidisciplinari per l'adeguata applicazione dei modelli matematici, degli strumenti computazionali e per l'appropriata interpretazione dei risultati.

In conclusione, la valutazione quali/quantitativa dei composti presenti nell'EBC rappresenta uno strumento semplice e non invasivo atto a individuare le alterazioni molecolari a livello dell'epitelio bronchiale coinvolte nelle diverse patologie respiratorie e nei loro differenti fenotipi, ma ulteriori studi e la risoluzione di alcuni problemi ancora irrisolti sono tappe necessarie perché la valutazione dell'EBC possa essere pienamente implementata nella pratica clinica.

Bibliografia

- 1 Pulik K, Mycroft K, Korczynski P, et al. Metabolomic analysis of respiratory epithelial lining fluid in patients with chronic obstructive pulmonary disease—a systematic review. *Cells* 2023;12:833. <https://doi.org/10.3390/cells12060833>.
- 2 Ochs M, Hegermann J, Lopez-Rodriguez E, et al. On top of the alveolar epithelium: surfactant and the glycocalyx. *Int J Mol Sci* 2020;21:3075. <https://doi.org/10.3390/ijms21093075>
- 3 Radha S, Afroz T, Prasad S, et al. Diagnostic utility of bronchoalveolar lavage. *J Cytol* 2014;3:136-138. <https://doi.org/10.4103/0970-9371.145636>.
- 4 Kostikas K, Koutsokera A, Papiiris S, et al. Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice. *Clin Exp Allergy* 2008;38:557-565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02940.x>
- 5 Ghelli F, Panizzolo M, Garzaro G, et al. Inflammatory biomarkers in exhaled breath condensate: a systematic review. *Int J Mol Sci* 2022;23:9820. <https://doi.org/10.3390/ijms23179820>
- 6 Seyfinejad B, Nemitlu E, Taghizadieh A, et al. Biomarkers in exhaled breath condensate as fingerprints of asthma, chronic obstructive pulmonary disease and asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap: a critical review. *Biomarkers Med* 2023;17:811-837. <https://doi.org/10.2217/bmm-2023-0420>
- 7 Caffarelli C, Calcinai E, Rinaldi L, et al. Hydrogen peroxide in exhaled breath condensate in asthmatic children during acute exacerbation and after treatment. *Respiration* 2012;84:291-298. <https://doi.org/10.1159/000341969>
- 8 Chen T, Liu T, Li T, et al. Exhaled breath analysis in disease detection. *Clin Chim Acta* 2021;515:61-72. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.12.036>.
- 9 Konstantinidi EM, Lappas AS, Tzortzi AS, Behrakis PK. Exhaled breath condensate: technical and diagnostic aspects. *ScientificWorldJournal* 2015;2015:435160. <https://doi.org/10.1155/2015/435160>

- ¹⁰ Maniscalco M, Paris D, Melck DJ, et al. Differential diagnosis between newly diagnosed asthma and COPD using exhaled breath condensate metabolomics: a pilot study. *Eur Respir J* 2018;51:1701825. <https://doi.org/10.1183/13993003.01825-2017>
- ¹¹ Maniscalco M, Paris D, Melck DJ, et al. Coexistence of obesity and asthma determines a distinct respiratory metabolic phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:1536-1547 e1535. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.038>
- ¹² Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, et al. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax* 2003;58:505-509. <https://doi.org/10.1136/thorax.58.6.505>
- ¹³ Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, et al. Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1290-1293. <https://doi.org/10.1164/rccm.2108082>
- ¹⁴ Bang G, Park JH, Park C, et al. High-resolution metabolomics-based biomarker discovery using exhaled breath condensate from patients with lung cancer. *J Anal Sci Technol* 2022;13:37.
- ¹⁵ Chen JL, Chen JR, Lv XD, et al. Epidermal growth factor in exhaled breath condensate as diagnostic method for non-small cell lung cancer. *Technol Cancer Res T* 2019;18:1533033819872271. <https://doi.org/10.1177/1533033819872271>
- ¹⁶ Chen JL, Han HN, Lv XD, et al. Clinical value of exhaled breath condensate let-7 in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2020;13:163-171.
- ¹⁷ Youssef O, Sarhadi VK, Armengol G, et al. Exhaled breath condensate as a source of biomarkers for lung carcinomas. A focus on genetic and epigenetic markers - A mini-review. *Genes Chromosomes Cancer* 2016;55:905-914. <https://doi.org/10.1002/gcc.22399>.
- ¹⁸ Maniscalco M, Paris D, Melck D, et al. Biomonitoring of workers using nuclear magnetic resonance-based metabolomics of exhaled breath condensate: a pilot study. *Toxicol Lett* 2018;298:4-12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.018>
- ¹⁹ Leese E, Jones K, Bocca B, et al. HBM4EU chromates study - the measurement of hexavalent and trivalent chromium in exhaled breath condensate samples from occupationally exposed workers across Europe. *Toxicol Lett* 2023;375:59-68. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.12.009>
- ²⁰ Khoubnasabjafari M, Rahimpour E, Jouyban A. Exhaled breath condensate as an alternative sample for drug monitoring. *Bioanalysis* 2018;10:61-64. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0205>
- ²¹ Pucsok JM, Gyore I, Argay K, et al. Effect of exercise on levels of cyclo-oxygenase mediators in exhaled breath condensate in elite athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 2007;47:223-227.
- ²² Horváth I, Barnes PJ, Loukides S, et al. A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease. *Eur Respir J* 2017;49:1600965. <https://doi.org/10.1183/13993003.00965-2016>
- ²³ Seifi M, Rastkari N, Hassanvand MS, et al. Investigating the relationship between particulate matter and inflammatory biomarkers of exhaled breath condensate and blood in healthy young adults. *Sci Rep* 2021;11:12922. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92333-6>