



Sommario

II Atti non legislativi

ACCORDI INTERNAZIONALI

- ★ **Decisione (UE) 2018/145 del Consiglio, del 9 ottobre 2017, relativa alla conclusione, a nome dell'Unione, dell'accordo multilaterale tra la Comunità europea e i suoi Stati membri, la Repubblica di Albania, la Bosnia-Erzegovina, la Repubblica di Bulgaria, la Repubblica di Croazia, l'ex Repubblica iugoslava di Macedonia, la Repubblica d'Islanda, la Repubblica di Montenegro, il Regno di Norvegia, la Romania, la Repubblica di Serbia e la Missione delle Nazioni Unite per l'amministrazione ad interim nel Kosovo*, sull'istituzione di uno Spazio aereo comune europeo (ECAA)** 1
- ★ **Decisione (UE) 2018/146 del Consiglio, del 22 gennaio 2018, relativa alla conclusione, a nome dell'Unione, dell'accordo euromediterraneo nel settore del trasporto aereo fra la Comunità europea e i suoi Stati membri, da un lato, e il Regno del Marocco, dall'altro lato** 4

REGOLAMENTI

- ★ **Regolamento (UE) 2018/147 del Consiglio, del 29 gennaio 2018, che modifica il regolamento (UE) n. 1370/2013, per quanto riguarda la limitazione quantitativa applicabile all'acquisto all'intervento di latte scremato in polvere** 6
- ★ **Regolamento delegato (UE) 2018/148 della Commissione, del 27 settembre 2017, che modifica gli allegati II, III e IV del regolamento (UE) n. 978/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'applicazione di un sistema di preferenze tariffarie generalizzate** 8
- ★ **Regolamento delegato (UE) 2018/149 della Commissione, del 15 novembre 2017, che modifica il regolamento delegato (UE) 2016/1238 per quanto riguarda i requisiti di composizione e le caratteristiche di qualità di latte e prodotti lattiero-caseari ammissibili all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato** 11

* Tale designazione non pregiudica le posizioni riguardo allo status ed è in linea con la risoluzione 1244/1999 dell'UNSC e con il parere della CIG sulla dichiarazione di indipendenza del Kosovo.

- ★ Regolamento di esecuzione (UE) 2018/150 della Commissione, del 30 gennaio 2018, che modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari ammissibili all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato 14
- ★ Regolamento di esecuzione (UE) 2018/151 della Commissione, del 30 gennaio 2018, recante modalità di applicazione della direttiva (UE) 2016/1148 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'ulteriore specificazione degli elementi che i fornitori di servizi digitali devono prendere in considerazione ai fini della gestione dei rischi posti alla sicurezza delle reti e dei sistemi informativi e dei parametri per determinare l'eventuale impatto rilevante di un incidente 48

DECISIONI

- ★ Decisione (UE) 2018/152 del Consiglio, del 29 gennaio 2018, relativa alla nomina di un supplente del Comitato delle regioni, conformemente alla proposta della Repubblica federale di Germania 52

Rettifiche

- ★ Rettifica del regolamento (UE) 2017/1084 della Commissione, del 14 giugno 2017, che modifica il regolamento (UE) n. 651/2014 per quanto riguarda gli aiuti alle infrastrutture portuali e aeroportuali, le soglie di notifica applicabili agli aiuti alla cultura e alla conservazione del patrimonio e agli aiuti alle infrastrutture sportive e alle infrastrutture ricreative multifunzionali, nonché i regimi di aiuti a finalità regionale al funzionamento nelle regioni ultraperiferiche, e modifica il regolamento (UE) n. 702/2014 per quanto riguarda il calcolo dei costi ammissibili (GU L 156 del 20.6.2017) 53

II

(Atti non legislativi)

ACCORDI INTERNAZIONALI

DECISIONE (UE) 2018/145 DEL CONSIGLIO

del 9 ottobre 2017

relativa alla conclusione, a nome dell'Unione, dell'accordo multilaterale tra la Comunità europea e i suoi Stati membri, la Repubblica di Albania, la Bosnia-Erzegovina, la Repubblica di Bulgaria, la Repubblica di Croazia, l'ex Repubblica iugoslava di Macedonia, la Repubblica d'Islanda, la Repubblica di Montenegro, il Regno di Norvegia, la Romania, la Repubblica di Serbia e la Missione delle Nazioni Unite per l'amministrazione ad interim nel Kosovo *, sull'istituzione di uno Spazio aereo comune europeo (ECAA)

IL CONSIGLIO DELL'UNIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea, in particolare l'articolo 100, paragrafo 2, in combinato disposto con l'articolo 218, paragrafo 6, lettera a),

vista la proposta della Commissione europea,

vista l'approvazione del Parlamento europeo ⁽¹⁾,

considerando quanto segue:

- (1) La Commissione ha negoziato, a nome della Comunità europea e degli Stati membri, un accordo multilaterale tra la Comunità europea e i suoi Stati membri, la Repubblica di Albania, la Bosnia-Erzegovina, la Repubblica di Bulgaria, la Repubblica di Croazia, l'ex Repubblica iugoslava di Macedonia, la Repubblica d'Islanda, la Repubblica di Montenegro, il Regno di Norvegia, la Romania, la Repubblica di Serbia e la Missione delle Nazioni Unite per l'amministrazione ad interim nel Kosovo, sull'istituzione di uno Spazio aereo comune europeo (ECAA) («accordo»).
- (2) L'accordo è stato firmato a nome della Comunità il 9 giugno 2006, fatta salva la sua conclusione in una data successiva, a norma della decisione 2006/682/CE del Consiglio e dei rappresentanti degli Stati membri dell'Unione europea riuniti in sede di Consiglio ⁽²⁾.
- (3) L'accordo è stato ratificato da tutti gli Stati membri.
- (4) In seguito alla loro adesione all'accordo, la Repubblica di Bulgaria, la Romania e la Repubblica di Croazia sono diventati Stati membri e, di conseguenza, hanno automaticamente cessato di essere parti associate ai sensi dell'accordo conformemente al suo articolo 31, paragrafo 2. Ciò dovrebbe essere ribadito in una notifica da effettuare all'atto del deposito dello strumento di approvazione dell'accordo.

* Tale designazione non pregiudica le posizioni riguardo allo status ed è in linea con la risoluzione 1244/1999 dell'UNSC e con il parere della CIG sulla dichiarazione di indipendenza del Kosovo.

⁽¹⁾ GU C 81 E del 15.3.2011, pag. 5.

⁽²⁾ Decisione 2006/682/CE del Consiglio e dei rappresentanti degli Stati membri dell'Unione europea, riuniti in sede di Consiglio del 9 giugno 2006 relativa alla firma e all'applicazione provvisoria dell'accordo multilaterale tra la Comunità europea ed i suoi Stati membri, la Repubblica di Albania, la Bosnia-Erzegovina, la Repubblica di Bulgaria, la Repubblica di Croazia, l'ex Repubblica iugoslava di Macedonia, la Repubblica d'Islanda, la Repubblica di Montenegro, il Regno di Norvegia, la Romania, la Repubblica di Serbia e la Missione delle Nazioni Unite per l'amministrazione ad interim nel Kosovo, sull'istituzione di uno Spazio aereo comune europeo (ECAA) (GU L 285 del 16.10.2006, pag. 1).

- (5) Relativamente alle modifiche dell'allegato I dell'accordo per quanto riguarda semplicemente l'inclusione della legislazione dell'Unione in tale allegato, che dovranno essere adottate dal comitato misto istituito a norma dell'articolo 18 dell'accordo, il potere di approvare tali modifiche a nome dell'Unione dovrebbe essere conferito alla Commissione, previa consultazione di un comitato speciale nominato dal Consiglio.
- (6) In tutti gli altri casi, la posizione che deve essere adottata, a nome dell'Unione, in sede di comitato misto per quanto riguarda le questioni che rientrano nella competenza dell'Unione dovrebbe essere definita caso per caso conformemente alle pertinenti disposizioni del trattato sul funzionamento dell'Unione europea (TFUE).
- (7) Poiché sia l'Unione che gli Stati membri sono parti dell'accordo, è fondamentale che cooperino strettamente tra loro. Al fine di assicurare tale stretta cooperazione e l'unità della rappresentanza esterna in sede di comitato misto e fatti salvi i trattati, in particolare l'articolo 16, paragrafo 1, del trattato sull'Unione europea e l'articolo 218, paragrafo 9, TFUE, è opportuno che sia posto in essere un coordinamento delle posizioni che devono essere adottate, a nome dell'Unione e degli Stati membri, in sede di comitato misto per quanto concerne questioni che rientrano nelle competenze sia dell'Unione sia degli Stati membri prima delle riunioni del comitato misto che trattano tali questioni.
- (8) L'articolo 2 della decisione 2006/682/CE contiene disposizioni sulla definizione delle posizioni che devono essere adottate in sede di comitato misto durante l'applicazione provvisoria dell'accordo. Alla luce della sentenza della Corte di giustizia del 28 aprile 2015 nella causa C-28/12, Commissione contro Consiglio ⁽¹⁾, tali disposizioni dovrebbero cessare di applicarsi a decorrere dalla data di entrata in vigore della presente decisione.
- (9) È opportuno approvare l'accordo,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

1. L'accordo multilaterale tra la Comunità europea e i suoi Stati membri, la Repubblica di Albania, la Bosnia-Erzegovina, la Repubblica di Bulgaria, la Repubblica di Croazia, l'ex Repubblica jugoslava di Macedonia, la Repubblica d'Islanda, la Repubblica di Montenegro, il Regno di Norvegia, la Romania, la Repubblica di Serbia e la Missione delle Nazioni Unite per l'amministrazione ad interim nel Kosovo, sull'istituzione di uno Spazio aereo comune europeo (ECAA), è approvato a nome dell'Unione ⁽²⁾.

2. Il presidente del Consiglio designa la persona o le persone abilitate a depositare, a nome dell'Unione, lo strumento di approvazione di cui all'articolo 29, paragrafo 2, dell'accordo ⁽³⁾ e a effettuare la notifica seguente:

«1. In conseguenza dell'entrata in vigore del trattato di Lisbona il 1° dicembre 2009, l'Unione europea ha sostituito ed è succeduta alla Comunità europea e da tale data esercita tutti i diritti e assume tutti gli obblighi della Comunità europea. Pertanto, i riferimenti alla "Comunità europea" nel testo dell'accordo si intendono fatti, ove opportuno, all'"Unione europea".

2. In seguito alla loro adesione all'Unione europea, la Repubblica di Bulgaria, la Romania e la Repubblica di Croazia sono diventati Stati membri dell'Unione europea e conformemente all'articolo 31, paragrafo 2, dell'accordo hanno cessato di conseguenza di essere parti associate ai sensi dell'accordo.».

Articolo 2

La posizione che deve essere adottata dall'Unione relativamente alle decisioni del comitato misto di cui all'articolo 17 dell'accordo per quanto riguarda semplicemente l'inclusione della legislazione dell'Unione nell'allegato I dell'accordo, previ eventuali adeguamenti tecnici necessari, è stabilita dalla Commissione, previa consultazione di un comitato speciale nominato dal Consiglio.

Articolo 3

L'articolo 2 della decisione 2006/682/CE cessa di applicarsi a decorrere dalla data di entrata in vigore della presente decisione.

⁽¹⁾ ECLI: EU: C: 2015:282.

⁽²⁾ L'accordo è stato pubblicato nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* (GU L 285 del 16.10.2006, pag. 3) unitamente alla decisione relativa alla firma e all'applicazione provvisoria.

⁽³⁾ La data di entrata in vigore dell'accordo sarà pubblicata nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* a cura del segretariato generale del Consiglio.

Articolo 4

La presente decisione entra in vigore il giorno dell'adozione.

Fatto a Luxembourg, il 9 ottobre 2017

Per il Consiglio

Il presidente

S. KIISLER

DECISIONE (UE) 2018/146 DEL CONSIGLIO**del 22 gennaio 2018****relativa alla conclusione, a nome dell'Unione, dell'accordo euromediterraneo nel settore del trasporto aereo fra la Comunità europea e i suoi Stati membri, da un lato, e il Regno del Marocco, dall'altro lato**

IL CONSIGLIO DELL'UNIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea, in particolare l'articolo 100, paragrafo 2, in combinato disposto con l'articolo 218, paragrafo 6, lettera a),

vista la proposta della Commissione europea,

vista l'approvazione del Parlamento europeo ⁽¹⁾,

considerando quanto segue:

- (1) La Commissione ha negoziato, a nome dell'Unione e degli Stati membri, un accordo euromediterraneo nel settore del trasporto aereo con il Regno del Marocco («accordo»), conformemente alla decisione del Consiglio che autorizza la Commissione ad avviare i negoziati.
- (2) L'accordo è stato firmato il 12 dicembre 2006 a norma della decisione 2006/959/CE del Consiglio e dei rappresentanti dei governi degli Stati membri riuniti in sede di Consiglio ⁽²⁾. L'accordo è stato ratificato da tutti gli Stati membri, a eccezione di Bulgaria, Romania e Croazia. È previsto che questi ultimi Stati membri aderiscano all'accordo conformemente all'articolo 6, paragrafo 2, dei rispettivi atti di adesione.
- (3) Relativamente alle modifiche di alcuni allegati dell'accordo che devono essere adottate dal comitato misto istituito a norma dell'articolo 22 dell'accordo, il potere di approvare tali modifiche a nome dell'Unione dovrebbe essere conferito alla Commissione, previa consultazione di un comitato speciale nominato dal Consiglio.
- (4) In tutti gli altri casi, le posizioni che devono essere adottate, a nome dell'Unione, in sede di comitato misto per quanto riguarda le questioni che rientrano nelle competenze dell'Unione, dovrebbero essere definite caso per caso conformemente alle pertinenti disposizioni del trattato sul funzionamento dell'Unione europea (TFUE).
- (5) Poiché sia l'Unione che gli Stati membri sono parti dell'accordo, è fondamentale che cooperino strettamente tra loro. Al fine di assicurare tale stretta cooperazione e l'unità della rappresentanza esterna in sede di comitato misto e fatti salvi i trattati, in particolare l'articolo 16, paragrafo 1, del trattato sull'Unione europea e l'articolo 218, paragrafo 9, TFUE, è opportuno che sia posto in essere un coordinamento delle posizioni che devono essere adottate, a nome dell'Unione e degli Stati membri, in sede di comitato misto per quanto concerne questioni che rientrano nelle competenze sia dell'Unione sia degli Stati membri prima delle riunioni del comitato misto che trattano tali questioni.
- (6) Gli articoli da 2 a 5 della decisione 2006/959/CE contengono disposizioni sul processo decisionale del Consiglio in merito a varie questioni contenute nell'accordo, tra cui la definizione delle posizioni che devono essere adottate in sede di comitato misto e gli obblighi di informazione degli Stati membri durante l'applicazione provvisoria dell'accordo. Tali disposizioni appaiono non necessarie ovvero la loro applicazione dovrebbe essere interrotta alla luce della sentenza della Corte di giustizia del 28 aprile 2015 nella causa C-28/12, Commissione contro Consiglio ⁽³⁾. È pertanto opportuno che tutte le disposizioni in questione cessino di applicarsi a decorrere dalla data di entrata in vigore della presente decisione.
- (7) È opportuno approvare l'accordo,

⁽¹⁾ GU C 81E del 15.3.2011, pag. 5.

⁽²⁾ Decisione del Consiglio e dei rappresentanti dei governi degli Stati membri riuniti in sede di Consiglio del 4 dicembre 2006 relativa alla firma e all'applicazione provvisoria dell'accordo euromediterraneo nel settore del trasporto aereo fra la Comunità europea e i suoi Stati membri, da un lato, e il Regno del Marocco, dall'altro lato (GU L 386 del 29.12.2006, pag. 55).

⁽³⁾ ECLI: UE: C 2015:282.

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

1. L'accordo euromediterraneo nel settore del trasporto aereo fra la Comunità europea e i suoi Stati membri, da un lato, e il Regno del Marocco, dall'altro lato, è approvato a nome dell'Unione ⁽¹⁾.
2. Il presidente del Consiglio è autorizzato a designare la persona o le persone abilitate a consegnare al Regno del Marocco le note diplomatiche previste dall'articolo 30 dell'accordo ⁽²⁾ e a effettuare la notifica seguente:

«In conseguenza dell'entrata in vigore del trattato di Lisbona il 1° dicembre 2009, l'Unione europea ha sostituito ed è succeduta alla Comunità europea e da tale data esercita tutti i diritti e assume tutti gli obblighi della Comunità europea. Pertanto, i riferimenti alla Comunità europea nel testo dell'accordo si intendono fatti, ove opportuno, all'«Unione europea».»

Articolo 2

Le posizioni che devono essere adottate dall'Unione in sede di comitato misto istituito a norma dell'articolo 22 dell'accordo per quanto riguarda la modifica degli allegati dell'accordo diversi dall'allegato I (Servizi concordati e rotte specificate) e dall'allegato IV (Disposizioni transitorie), sono stabilite dalla Commissione, previa consultazione del comitato speciale nominato dal Consiglio.

Articolo 3

Gli articoli da 2 a 5 della decisione 2006/959/CE cessano di applicarsi a decorrere dalla data di entrata in vigore della presente decisione.

Articolo 4

La presente decisione entra in vigore il giorno dell'adozione.

Fatto a Bruxelles, il 22 gennaio 2018

Per il Consiglio

Il presidente

F. MOGHERINI

⁽¹⁾ L'accordo è stato pubblicato nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* (GU L 386 del 29.12.2006, pag. 57) unitamente alla decisione relativa alla firma e all'applicazione provvisoria.

⁽²⁾ La data di entrata in vigore dell'accordo sarà pubblicata nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* a cura del segretariato generale del Consiglio.

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO (UE) 2018/147 DEL CONSIGLIO

del 29 gennaio 2018

che modifica il regolamento (UE) n. 1370/2013, per quanto riguarda la limitazione quantitativa applicabile all'acquisto all'intervento di latte scremato in polvere

IL CONSIGLIO DELL'UNIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea, in particolare l'articolo 43, paragrafo 3,

vista la proposta della Commissione europea,

considerando quanto segue:

- (1) I quantitativi di latte scremato in polvere giacenti all'intervento pubblico nell'Unione ammontavano a fine luglio 2017 a 357 359 tonnellate. Altre 22 710 tonnellate sono state offerte per l'acquisto a prezzo fisso fino alla chiusura del periodo di intervento, il 30 settembre 2017.
- (2) Nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari si assiste attualmente a uno sfasamento senza precedenti tra i prezzi delle materie grasse e delle proteine, a motivo di una domanda particolarmente elevata di burro.
- (3) Si prevede che le consegne di latte nell'Unione aumenteranno nel 2018, con un conseguente aumento della produzione di burro e latte scremato in polvere.
- (4) Grazie all'andamento decisamente positivo della domanda di burro e formaggi, e nonostante i prezzi relativamente bassi delle proteine del latte, nel 2018 i prezzi del latte crudo che devono essere pagati agli agricoltori dovrebbero mantenersi a livelli tali da garantire la remuneratività della produzione lattiera.
- (5) Tali elementi di mercato creano per l'anno 2018 una situazione eccezionale di cui occorre tenere conto in modo specifico con riguardo al funzionamento del meccanismo di intervento pubblico per i prodotti lattiero-caseari.
- (6) L'articolo 3 del regolamento (UE) n. 1370/2013 del Consiglio ⁽¹⁾ fissa una limitazione quantitativa per gli acquisti all'intervento di latte scremato in polvere al prezzo fisso di cui all'articolo 2 dello stesso regolamento. Una volta raggiunto tale limite, gli acquisti all'intervento devono essere effettuati mediante una procedura di gara volta a determinare il prezzo massimo di acquisto.
- (7) Al fine di evitare acquisti all'intervento di latte scremato in polvere a prezzo fisso in una situazione in cui ciò contravverrebbe agli obiettivi della rete di sicurezza, qualsiasi intervento pubblico per il latte scremato in polvere dovrebbe avvenire nell'ambito di una procedura di gara. A tal fine è opportuno fissare a zero, per il 2018, la limitazione quantitativa per l'acquisto all'intervento di latte scremato in polvere a prezzo fisso.
- (8) È opportuno pertanto modificare di conseguenza il regolamento (UE) n. 1370/2013.
- (9) Per far sì che la misura temporanea di cui al presente regolamento abbia un impatto immediato sul mercato e per consentire agli operatori di essere informati in tempo utile prima dell'inizio della prossima campagna di intervento, è opportuno che il presente regolamento entri in vigore il giorno successivo alla pubblicazione,

⁽¹⁾ Regolamento (UE) n. 1370/2013 del Consiglio, del 16 dicembre 2013, recante misure per la fissazione di determinati aiuti e restituzioni connessi all'organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli (GU L 346 del 20.12.2013, pag. 12).

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

All'articolo 3, paragrafo 1, del regolamento (UE) n. 1370/2013 è aggiunto il comma seguente:

«In deroga al primo comma, nel 2018 la limitazione quantitativa per gli acquisti all'intervento di latte scremato in polvere a prezzo fisso è fissata a 0 tonnellate.».

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 29 gennaio 2018

Per il Consiglio
Il presidente
R. PORODZANOV

REGOLAMENTO DELEGATO (UE) 2018/148 DELLA COMMISSIONE**del 27 settembre 2017****che modifica gli allegati II, III e IV del regolamento (UE) n. 978/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'applicazione di un sistema di preferenze tariffarie generalizzate**

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (UE) n. 978/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 25 ottobre 2012, relativo all'applicazione di un sistema di preferenze tariffarie generalizzate e che abroga il regolamento (CE) n. 732/2008 del Consiglio ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 5, paragrafo 3, l'articolo 10, paragrafo 5, e l'articolo 17, paragrafo 2,

considerando quanto segue:

- (1) L'articolo 4 del regolamento (UE) n. 978/2012 stabilisce i criteri per la concessione delle preferenze tariffarie nel contesto del regime generale del sistema di preferenze generalizzate («SPG»).
- (2) L'articolo 4, paragrafo 1, lettere a) e b), del regolamento (UE) n. 978/2012 stabilisce che un paese classificato dalla Banca mondiale come paese a reddito alto o medio-alto nel corso di tre anni consecutivi o un paese che beneficia di un regime d'accesso preferenziale al mercato che offre, per la quasi totalità degli scambi, le stesse preferenze tariffarie del sistema o condizioni più favorevoli non dovrebbero beneficiare delle preferenze dell'SPG.
- (3) L'elenco dei paesi beneficiari del regime generale dell'SPG di cui all'articolo 1, paragrafo 2, lettera a), del regolamento (UE) n. 978/2012 figura nell'allegato II di tale regolamento. A norma dell'articolo 5, paragrafo 2, del regolamento (UE) n. 978/2012, l'allegato II è soggetto a riesame entro il 1° gennaio di ogni anno. Tale riesame dovrebbe prendere in considerazione i cambiamenti delle condizioni economiche, di sviluppo o commerciali dei paesi beneficiari in rapporto ai criteri stabiliti nell'articolo 4.
- (4) L'articolo 5, paragrafo 2, del regolamento (UE) n. 978/2012 prevede di lasciare al paese beneficiario dell'SPG e agli operatori economici il tempo di adattarsi correttamente al riesame dello status SPG del paese. Occorre pertanto che l'SPG sia mantenuto per un anno dopo la data di entrata in vigore del cambiamento di status di un paese come previsto dall'articolo 4, paragrafo 1, lettera a), e per un periodo di due anni dalla data di applicazione di un regime di accesso preferenziale al mercato, come previsto dall'articolo 4, paragrafo 1, lettera b).
- (5) Il Paraguay è stato classificato dalla Banca mondiale come paese a reddito medio-alto nel 2015, 2016 e 2017. Il Paraguay pertanto non possiede più i requisiti per beneficiare dello status di paese beneficiario dell'SPG di cui all'articolo 4, paragrafo 1, lettera a), del regolamento (UE) n. 978/2012 e dovrebbe essere eliminato dall'elenco dei paesi beneficiari del regime SPG figurante nell'allegato II di detto regolamento, con applicazione dal 1° gennaio 2019.
- (6) I regimi di accesso preferenziale al mercato sono entrati in vigore per la Costa d'Avorio il 3 settembre 2016, per lo Swaziland il 10 ottobre 2016 e per il Ghana il 15 dicembre 2016. A norma pertanto dell'articolo 4, paragrafo 1, lettera b), la Costa d'Avorio, lo Swaziland e il Ghana dovrebbero anche essere eliminati dall'allegato II del regolamento (UE) n. 978/2012 con applicazione dal 1° gennaio 2019.
- (7) L'articolo 9, paragrafo 1, del regolamento (UE) n. 978/2012 stabilisce criteri specifici di ammissibilità per la concessione delle preferenze tariffarie previste a titolo del regime speciale di incentivazione per lo sviluppo sostenibile e il buon governo (SPG+) ai paesi beneficiari dell'SPG. L'elenco dei paesi beneficiari dell'SPG+ figura nell'allegato III del regolamento (UE) n. 978/2012.
- (8) Cessando di essere beneficiario dell'SPG a decorrere dal 1° gennaio 2019, il Paraguay cessa anche di essere beneficiario dell'SPG+ a norma dell'articolo 9, paragrafo 1, del regolamento (UE) n. 978/2012. Il Paraguay dovrebbe pertanto essere eliminato dall'allegato III di tale regolamento con applicazione dal 1° gennaio 2019.

⁽¹⁾ GUL 303 del 31.10.2012, pag. 1.

- (9) L'articolo 17, paragrafo 1, del regolamento (UE) n. 978/2012 stabilisce che un paese beneficia delle preferenze tariffarie previste a titolo del regime speciale per i paesi meno sviluppati [«Tutto tranne le armi - Everything But Arms (EBA)»] se è definito dalle Nazioni Unite come paese meno sviluppato. L'elenco dei paesi beneficiari dell'EBA figura nell'allegato IV di tale regolamento.
- (10) Le Nazioni unite hanno depennato la Guinea equatoriale dalla categoria dei paesi meno- sviluppati il 4 giugno 2017. Di conseguenza la Guinea equatoriale non possiede più i requisiti per avvalersi dello status di beneficiario dell'EBA a norma dell'articolo 17, paragrafo 1, del regolamento (UE) n. 978/2012 e dovrebbe essere rimossa dall'allegato IV dello stesso regolamento. A norma dell'articolo 17, paragrafo 2, del regolamento (UE) n. 978/2012 l'eliminazione della Guinea equatoriale dall'elenco dei paesi beneficiari dell'EBA dovrebbe applicarsi al termine di un periodo transitorio di tre anni dalla data di entrata in vigore del regolamento, vale a dire dal 1° gennaio 2021.
- (11) La Guinea equatoriale è stata inoltre classificata dalla Banca mondiale come paese a reddito alto nel 2015 e medio-alto nel 2016 e 2017. La Guinea equatoriale pertanto non possiede più i requisiti per beneficiare dello status dei paesi beneficiari dell'SPG di cui all'articolo 4, paragrafo 1, lettera a), del regolamento (UE) n. 978/2012 e dovrebbe anche essere eliminata dall'elenco dei paesi beneficiari dell'SPG figurante nell'allegato II di detto regolamento, con applicazione dal 1° gennaio 2021,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Modifiche del regolamento (UE) n. 978/2012

Il regolamento (UE) n. 978/2012 è così modificato:

- 1) nell'allegato II, i seguenti codici alfabetici e i paesi corrispondenti sono eliminati rispettivamente dalle colonne A e B:

CI	Costa d'Avorio
GH	Ghana
PY	Paraguay
SZ	Swaziland

- 2) nell'allegato III, il seguente codice alfabetico e il paese corrispondente sono eliminati rispettivamente dalle colonne A e B:

PY	Paraguay
----	----------

- 3) negli allegati II e IV, il seguente codice alfabetico e il paese corrispondente sono eliminati rispettivamente dalle colonne A e B:

GQ	Guinea equatoriale
----	--------------------

Articolo 2

Entrata in vigore e applicazione

Il presente regolamento entra in vigore il 1° gennaio 2018.

L'articolo 1, paragrafi 1 e 2, si applica a decorrere dal 1° gennaio 2019.

L'articolo 1, paragrafo 3, si applica a decorrere dal 1° gennaio 2021.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 27 settembre 2017

Per la Commissione

Il presidente

Jean-Claude JUNCKER

REGOLAMENTO DELEGATO (UE) 2018/149 DELLA COMMISSIONE**del 15 novembre 2017****che modifica il regolamento delegato (UE) 2016/1238 per quanto riguarda i requisiti di composizione e le caratteristiche di qualità di latte e prodotti lattiero-caseari ammissibili all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato**

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (UE) n. 1308/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 dicembre 2013, recante organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli e che abroga i regolamenti (CEE) n. 922/72, (CEE) n. 234/79, (CE) n. 1037/2001 e (CE) n. 1234/2007 del Consiglio ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 19, paragrafo 1, lettera a),

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento delegato (UE) n. 2016/1238 della Commissione ⁽²⁾ stabilisce i requisiti di composizione e le caratteristiche di qualità del latte e dei prodotti lattiero-caseari ammissibili all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato.
- (2) In seguito ai miglioramenti tecnici della metodologia utilizzata per l'analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari e al fine di allineare le vigenti norme dell'Unione relative ai requisiti in materia di igiene, occorre riesaminare e aggiornare i parametri dei requisiti di composizione e le caratteristiche di qualità di taluni prodotti lattiero-caseari ammissibili all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato.
- (3) Gli allegati IV e V del regolamento delegato (UE) 2016/1238 dovrebbero pertanto essere modificati di conseguenza,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Gli allegati del regolamento delegato (UE) 2016/1238 sono così modificati:

- a) la parte II dell'allegato IV è sostituita dal testo riportato nell'allegato I del presente regolamento;
- b) la parte II dell'allegato V è sostituita dal testo riportato nell'allegato II del presente regolamento.

*Articolo 2*Il presente regolamento entra in vigore il settimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 15 novembre 2017

*Per la Commissione**Il presidente*

Jean-Claude JUNCKER

⁽¹⁾ GUL 347 del 20.12.2013, pag. 671.⁽²⁾ Regolamento delegato (UE) 2016/1238 della Commissione, del 18 maggio 2016, che integra il regolamento (UE) n. 1308/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'intervento pubblico e l'aiuto all'ammasso privato (GU L 206 del 30.7.2016, pag. 15).

ALLEGATO I

«PARTE II

Requisiti di composizione e caratteristiche di qualità

Il burro è un'emulsione solida, sostanzialmente del tipo "acqua in olio", che presenta le seguenti caratteristiche di composizione e di qualità:

Parametri	Tenore e caratteristiche di qualità
Grasso	Minimo 82 %
Acqua	Massimo 16 %
Materie secche non grasse	Massimo 2 %
Acidità delle materie grasse	Max 1,2 mmol/100 g di materie grasse
Indice di perossidi	Max 0,3 mequiv di ossigeno/1 000 g di materie grasse
Grassi diversi da quelli del latte	Non rilevabili con l'analisi dei trigliceridi
Caratteristiche organolettiche	Almeno quattro punti su cinque per quanto riguarda l'aspetto, il gusto e la consistenza»

ALLEGATO II

«PARTE II

Requisiti di composizione e caratteristiche di qualità

Parametri	Tenore e caratteristiche di qualità
Proteine	Minimo 34,0 % sull'estratto secco non grasso
Grasso	Massimo 1,00 %
Acqua	Massimo 3,5 %
Acidità titolabile in millilitri di soluzione di idrossido di sodio normaldecimo	Massimo 19,5 ml
Lattati	Massimo 150 mg/100 g
Prova di fosfatasi	Negativo, cioè un'attività fosfatasica uguale o inferiore a 350 mU per litro di latte ricostituito
Indice di insolubilità	Massimo 0,5 ml (24 °C)
Particelle combuste	Massimo 15,0 mg, cioè almeno disco B
Microrganismi	Massimo 40 000 UFC per grammo
Latticello ⁽¹⁾	Assente ⁽²⁾
Siero di latte presamico ⁽³⁾	Assente
Siero di latte acido ⁽³⁾	Assente ⁽⁴⁾ o al massimo 150 mg/100 g ⁽⁵⁾
Gusto e odore	Puliti
Aspetto	Colore bianco o leggermente paglierino, assenza di impurità e di particelle colorate

⁽¹⁾ Per latticello si intende il sottoprodotto della produzione del burro, ottenuto dopo zangolatura o burrificazione della crema e separazione della fase grassa solida.

⁽²⁾ L'assenza di latticello è determinata mediante un controllo senza preavviso nello stabilimento di produzione, effettuato almeno una volta alla settimana, oppure mediante analisi di laboratorio del prodotto finito da cui risultino al massimo 69,31 mg di PEDP (dipalmitoilfosfatidiletanolamina)/100 g.

⁽³⁾ Per siero di latte si intende il sottoprodotto della produzione del formaggio o della caseina, ottenuto dall'azione degli acidi, del caglio e/o dei processi chimico-fisici.

⁽⁴⁾ quando vengono effettuati controlli in loco.

⁽⁵⁾ quando si applica la norma ISO 8069»

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2018/150 DELLA COMMISSIONE**del 30 gennaio 2018****che modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari ammissibili all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato**

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (UE) n. 1306/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 dicembre 2013, sul finanziamento, sulla gestione e sul monitoraggio della politica agricola comune e che abroga i regolamenti (CEE) n. 352/78, (CE) n. 165/94, (CE) n. 2799/98, (CE) n. 814/2000, (CE) n. 1290/2005 e (CE) n. 485/2008 del Consiglio ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 62, paragrafo 2, lettera i),

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento delegato (UE) 2016/1238 della Commissione ⁽²⁾ e il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 della Commissione ⁽³⁾ stabiliscono le norme in materia di intervento pubblico e di aiuto all'ammasso privato. Il regolamento (CE) n. 273/2008 della Commissione ⁽⁴⁾ stabilisce i metodi applicabili per determinare se il latte e i prodotti lattiero-caseari soddisfano i requisiti di ammissibilità previsti nei suddetti regolamenti per l'intervento pubblico e l'aiuto all'ammasso privato.
- (2) Gli sviluppi tecnici realizzati nella metodologia impiegata per l'analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari rendono opportuno introdurre alcune modifiche sostanziali a fini di semplificazione e per fornire riferimenti aggiornati alle norme ISO. A fini di chiarezza e razionalità, e vista la portata e la natura tecnica delle modifiche alle disposizioni del regolamento (CE) n. 273/2008, le disposizioni pertinenti di tale regolamento dovrebbero essere incorporate nel regolamento (UE) 2016/1240.
- (3) Al fine di assicurare la conformità con le nuove norme e i nuovi metodi in tutti gli Stati membri, i laboratori dovrebbero poter disporre di un periodo di tempo sufficiente per rivedere le procedure e applicare i metodi aggiornati.
- (4) È pertanto opportuno modificare di conseguenza il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240.
- (5) Ai fini della certezza del diritto è opportuno abrogare il regolamento (CE) n. 273/2008.
- (6) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del Comitato per l'organizzazione comune dei mercati agricoli,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Il regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 è così modificato:

1) L'articolo 4 è così modificato:

a) il paragrafo 1 è così modificato:

i) la lettera d) è sostituita dalla seguente:

«d) per il burro: nell'allegato IV, parti I e I bis, del presente regolamento;»

ii) la lettera e) è sostituita dalla seguente:

«e) per il latte scremato in polvere: nell'allegato V, parti I e I bis, del presente regolamento.»;

⁽¹⁾ GU L 347 del 20.12.2013, pag. 549.

⁽²⁾ Regolamento delegato (UE) 2016/1238 della Commissione, del 18 maggio 2016, che integra il regolamento (UE) n. 1308/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'intervento pubblico e l'aiuto all'ammasso privato (GU L 206 del 30.7.2016, pag. 15).

⁽³⁾ Regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 della Commissione, del 18 maggio 2016, recante modalità di applicazione del regolamento (UE) n. 1308/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'intervento pubblico e l'aiuto all'ammasso privato (GU L 206 del 30.7.2016, pag. 71).

⁽⁴⁾ Regolamento (CE) n. 273/2008 della Commissione, del 5 marzo 2008, che stabilisce modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1255/1999 del Consiglio per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari (GU L 88 del 29.3.2008, pag. 1).

b) il paragrafo 2 è sostituito dal seguente:

«2. I metodi per determinare la qualità dei cereali, del burro e del latte scremato in polvere ammissibili all'intervento pubblico di cui agli allegati I, IV e V rispettivamente, sono definiti nell'ultima versione delle pertinenti norme europee o internazionali, secondo il caso, in vigore almeno 6 mesi prima del primo giorno del periodo d'intervento pubblico quale definito all'articolo 12 del regolamento (UE) n. 1308/2013.»;

2) è inserito il seguente articolo 60 bis:

«Articolo 60 bis

Disposizioni specifiche sui controlli relativi all'intervento pubblico e all'aiuto all'ammasso privato per il latte e i prodotti lattiero-caseari

1. L'ammissibilità del burro, del latte scremato in polvere e del formaggio al beneficio degli aiuti all'ammasso privato è stabilita secondo i metodi previsti negli allegati VI, VII e VIII rispettivamente.

Tali metodi sono stabiliti facendo riferimento all'ultima versione delle pertinenti norme europee o internazionali, secondo il caso, in vigore almeno 6 mesi prima del primo giorno del periodo d'intervento pubblico quale definito all'articolo 12 del regolamento (UE) n. 1308/2013.

2. I risultati dei controlli effettuati applicando i metodi stabiliti nel presente regolamento sono valutati conformemente all'allegato IX.»;

3) gli allegati sono modificati conformemente all'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

Il regolamento (CE) n. 273/2008 è abrogato.

Articolo 3

Il presente regolamento entra in vigore il settimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 30 gennaio 2018

Per la Commissione

Il presidente

Jean-Claude JUNCKER

ALLEGATO

Gli allegati del regolamento di esecuzione (UE) 2016/1240 sono così modificati:

1) l'allegato IV è così modificato:

a) nella parte I, punto 2, il secondo comma è sostituito dal seguente:

«Ciascun campione deve essere valutato singolarmente. Non sono ammesse ripetizioni del campionamento e della valutazione.»;

b) è aggiunta la seguente parte I bis:

«PARTE I bis

Metodi di analisi del burro non salato destinato all'intervento pubblico

Parametro	Metodo
Grasso ⁽¹⁾	ISO 17189 o ISO 3727 parte 3
Acqua	ISO 3727 parte 1
Materie secche non grasse	ISO 3727 parte 2
Acidità delle materie grasse	ISO 1740
Indice di perossidi	ISO 3976
Grassi diversi da quelli del latte	ISO 17678
Caratteristiche organolettiche	ISO 22935 parti 2 e 3 e tabella di punteggio di seguito riportata.

⁽¹⁾ Il metodo da applicare è riconosciuto dall'organismo pagatore.

Tabella di punteggio

Aspetto		Consistenza		Gusto e aroma	
Punti	Osservazioni	Punti	Osservazioni	Punti	Osservazioni
5	<i>Molto buono</i> tipo ideale massima qualità (uniformemente asciutto)	5	<i>Molto buono</i> tipo ideale massima qualità (ben spalmabile)	5	<i>Molto buono</i> tipo ideale massima qualità (aroma finissimo asso- lutamente puro)
4	<i>Buono</i> (nessun difetto evi- dente)	4	<i>Buono</i> (nessun difetto evi- dente)	4	<i>Buono</i> (nessun difetto evi- dente)
1, 2 o 3	Qualunque difetto	1, 2 o 3	Qualunque difetto	1, 2 o 3	Qualunque difetto»

2) all'allegato V è aggiunta la seguente parte I bis:

«PARTE I bis

Metodi di analisi del latte scremato in polvere destinato all'intervento pubblico

Parametro	Metodo
Proteine	ISO 8968 parte 1
Grasso	ISO 1736
Acqua	ISO 5537
Acidità	ISO 6091
Lattati	ISO 8069
Prova di fosfatasi	ISO 11816 parte 1
Indice di insolubilità	ISO 8156
Particelle combuste ⁽¹⁾	ADPI
Microrganismi	ISO 4833 parte 1
Latticello	Appendice I
Siero di latte presamico ⁽²⁾	Appendici II e III
Siero di latte acido ⁽³⁾	ISO 8069 o controlli in loco
Controlli organolettici ⁽⁴⁾	ISO 22935 parti 2 e 3

⁽¹⁾ L'analisi delle particelle combuste può essere effettuata sistematicamente. Tuttavia, tale analisi deve essere effettuata in ogni caso se non vengono effettuati controlli organolettici.

⁽²⁾ Il metodo da applicare è riconosciuto dall'organismo pagatore (uno o entrambi i metodi).

⁽³⁾ Il metodo da applicare è riconosciuto dall'organismo pagatore.

⁽⁴⁾ I controlli organolettici sono effettuati se ritenuti necessari previa un'analisi del rischio riconosciuta dall'organismo pagatore.

Appendice I

LATTE SCREMATO IN POLVERE: DETERMINAZIONE DELLA QUANTITÀ DI FOSFATIDILSERINA E FOSFATIDILETANOLAMINA**Metodo: HPLC in fase inversa**

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo descrive una procedura per la determinazione quantitativa della fosfatidilserina (PS) e della fosfatidiletanolamina (PE) nel latte scremato in polvere (LSP) ed è adatto per rivelare particelle solide di latticello nel LSP.

2. DEFINIZIONE

Contenuto di PS + PE: la frazione in massa di sostanza determinata utilizzando la procedura qui specificata. Il risultato è espresso in milligrammi di dipalmitoilfosfatidiletanolamina (PEDP) per 100 g di polvere.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Estrazione degli amminofosfolipidi mediante metanolo da latte in polvere ricostituito. Determinazione di PS e PE come derivati della dialdeide o-ftalica (OPA) mediante HPLC in fase inversa (RP) e rivelazione per fluorescenza. Quantificazione del contenuto di PS e PE nel campione d'analisi per riferimento ad un campione standard contenente una quantità nota di PEDP.

4. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua deve essere distillata o di purezza almeno equivalente, salvo diversamente specificato.

4.1. **Materiale standard: PEDP, purezza 99 % minimo**

Nota: Il materiale standard deve essere conservato a - 18 °C.

4.2. **Reagenti per le preparazioni del campione standard e del campione d'analisi**4.2.1. *Metanolo per HPLC*4.2.2. *Cloroformio per HPLC*4.2.3. *Triptamina monoclorigrato*4.3. **Reagenti per la derivatizzazione con dialdeide o-ftalica**4.3.1. *Idrossido di sodio, soluzione acquosa 12M*4.3.2. *Acido bórico, soluzione acquosa 0,4M regolata a pH 10,0 con idrossido di sodio (4.3.1)*4.3.3. *2-mercaptoetanololo*4.3.4. *Dialdeide o-ftalica (OPA)*4.4. **Solventi per l'eluizione HPLC**4.4.1. *I solventi di eluizione devono essere preparati utilizzando reagenti per HPLC*4.4.2. *Acqua per HPLC*4.4.3. *Metanolo di purezza fluorimetrica controllata*4.4.4. *Tetraidrofurano*4.4.5. *Diidrogenofosfato di sodio*4.4.6. *Acetato di sodio*4.4.7. *Acido acetico*

5. APPARECCHIATURA

5.1. **Bilancia analitica, in grado di pesare con l'approssimazione di 1 mg e con risoluzione di 0,1 mg**5.2. **Becher da 25 e 100 ml**5.3. **Pipette da 1 e 10 ml**5.4. **Agitatore magnetico**5.5. **Pipette graduate da 0,2, 0,5 e 5 ml**5.6. **Matracci tarati da 10, 50 e 100 ml**5.7. **Siringhe da 20 e 100 μ l**5.8. **Bagno ad ultrasuoni**5.9. **Centrifuga a 27 000 \times g**5.10. **Flaconi di vetro della capacit  di circa 5 ml**5.11. **Cilindro graduato da 25 ml**5.12. **pH-metro, con l'approssimazione di 0,1 unit  di pH**5.13. **Apparecchiatura HPLC**5.13.1. *Sistema di pompaggio a gradiente in grado di funzionare a 1,0 ml/min a 200 bar*5.13.2. *Autocampionatore con possibilit  di derivatizzazione*5.13.3. *Riscaldatore di colonna termostato a 30 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C*5.13.4. *Rivelatore a fluorescenza regolato alla lunghezza d'onda di eccitazione di 330 nm e alla lunghezza d'onda di emissione di 440 nm*5.13.5. *Integratore o software di elaborazione dati in grado di misurare l'area dei picchi*5.13.6. *Una colonna LiChrosphere[®] — 100 (250 \times 4,6 mm) o una colonna equivalente riempita con ottadecilsilano (C 18), granulometria 5 μ m.*

6. CAMPIONAMENTO

Il campionamento deve essere eseguito secondo la norma ISO 707.

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparazione della soluzione dello standard interno**7.1.1. *Pesare 30,0 \pm 0,1 mg di triptamina monoclorigrato (4.2.3) in un matraccio tarato da 100 ml (5.6) e portare alla tacca con metanolo (4.2.1).*7.1.2. *Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 10 ml (5.6) e integrare alla tacca con metanolo (4.2.1) in modo da ottenere una concentrazione di triptamina pari a 0,15 mM.*7.2. **Preparazione della soluzione campione d'analisi**7.2.1. *Pesare 1,000 \pm 0,001 g del campione di LSP in un becher da 25 ml (5.2). Aggiungere 10 ml di acqua distillata a 40 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C mediante una pipetta (5.3) e agitare con l'agitatore magnetico (5.4) per 30 minuti per sciogliere eventuali grumi.*7.2.2. *Pipettare 0,2 ml (5.5) del latte ricostituito in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 100 μ l della soluzione di triptamina 0,15 mM (7.1) con una siringa (5.7) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Miscelare accuratamente capovolgendo il matraccio e sottoponendolo a bagno ultrasonico (5.8) per 15 minuti.*7.2.3. *Centrifugare (5.9) a 27 000 g per 10 minuti e raccogliere il surnatante in un flacone di vetro (5.10).*

Nota: La soluzione campione deve essere conservata a 4 $^{\circ}$ C fino al momento dell'esecuzione dell'analisi HPLC.

7.3. Preparazione della soluzione dello standard esterno

- 7.3.1. Pesare 55,4 mg di PEDP (4.1) in un matraccio tarato da 50 ml (5.6) e aggiungere circa 25 ml di cloroformio (4.2.2) mediante un cilindro graduato (5.11). Riscaldare il matraccio tappato a $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e miscelare accuratamente fino a quando il PEDP si scioglie. Raffreddare il matraccio a 20 °C , portare a volume con metanolo (4.2.1) e miscelare capovolgendolo.
- 7.3.2. Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 100 ml (5.6) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Pipettare 1 ml (5.3) di questa soluzione in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 100 μl (5.7) di soluzione di triptamina 0,15 mM (7.1) e portare a volume con metanolo (4.2.1). Miscelare mediante capovolgimento.

Nota: La soluzione del campione deve essere conservata a 4 °C fino al momento dell'esecuzione dell'analisi HPLC.

7.4. Preparazione del reagente di derivatizzazione

Pesare $25,0 \pm 0,1$ mg di OPA (4.3.4) in un matraccio tarato da 10 ml (5.6), aggiungere 0,5 ml (5.5) di metanolo (4.2.1) e miscelare accuratamente per sciogliere l'OPA. Portare alla tacca con soluzione di acido borico (4.3.2) e aggiungere 20 μl di 2-mercaptoetanolo (4.3.3) con una siringa (5.7).

Nota: Il reagente di derivatizzazione deve essere conservato a 4 °C in un flacone scuro; in tal modo rimane stabile per una settimana.

7.5. Determinazione HPLC**7.5.1. Solventi di eluizione (4.4)**

Solvente A: soluzione di diidrogenofosfato di sodio 0,3 mM e di acetato di sodio 3 mM (regolata a pH $6,5 \pm 0,1$ con acido acetico): metanolo:tetraidrofurano = 558:440:2 (v/v/v)

Solvente B: metanolo

7.5.2. Gradiente di eluizione consigliato:

Durata (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Portata (ml/min)
Iniziale	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Nota: Il gradiente di eluizione può richiedere leggere modifiche per ottenere la risoluzione mostrata in figura 1.

Temperatura della colonna: 30 °C .

7.5.3. Volume di iniezione: 50 µl di reagente di derivatizzazione e 50 µl di soluzione campione.

7.5.4. Equilibratura della colonna

Tutti i giorni, all'avviamento del sistema fluxare la colonna con solvente B al 100 % per 15 minuti, regolarla poi su A:B = 40:60 ed equilibrarla a 1 ml/min per 15 minuti. Eseguire una prova in bianco iniettando metanolo (4.2.1).

Nota: Se si prevede di non usare la colonna per un tempo prolungato, fluxarla con metanolo: cloroformio = 80:20 (v/v) per 30 minuti.

7.5.5. Determinazione del contenuto di PS + PE nel campione d'analisi

7.5.6. Eseguire la sequenza delle analisi cromatografiche mantenendo costante il tempo da una prova all'altra allo scopo di ottenere tempi di ritenzione costanti. Iniettare la soluzione dello standard esterno (7.3) ogni 5-10 soluzioni del campione d'analisi per calcolare il coefficiente di risposta.

Nota: La colonna deve essere pulita mediante fluxaggio con solvente B al 100 % (7.5.1) per almeno 30 minuti ogni 20-25 prove.

7.6. **Modalità di integrazione**

7.6.1. Picco PEDP

Il PEDP viene eluito come picco singolo. Determinare l'area del picco mediante integrazione da valle a valle.

7.6.2. Picco della triptamina

La triptamina viene eluita come picco singolo (figura 1). Determinare l'area del picco mediante integrazione da valle a valle.

7.6.3. Gruppo dei picchi PS e PE

Nelle condizioni descritte (figura 1), la PS eluisce nella forma di due picchi principali parzialmente non risolti preceduti da un picco minore; la PE eluisce nella forma di tre picchi principali parzialmente non risolti. Determinare l'area totale di ciascun gruppo di picchi fissando la linea di base come indicato nella figura 1.

8. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Calcolare il contenuto di PS e PE nel campione d'analisi con la formula seguente:

$$C = 55,36 \times [(A_2)/(A_1)] \times [(T_1)/(T_2)]$$

dove:

C = contenuto di PS o PE (mg/100 g di polvere) nel campione d'analisi;

A₁ = area del picco della PEDP della soluzione campione standard (7.3);

A₂ = area del picco PS o PE della soluzione campione d'analisi (7.3);

T₁ = area del picco della triptamina della soluzione campione standard (7.3);

T₂ = area del picco della triptamina della soluzione campione d'analisi (7.2).

9. PRECISIONE DEL METODO

Nota: I valori della ripetibilità sono stati calcolati secondo la norma internazionale FIL (*).

9.1. **Ripetibilità**

La deviazione standard relativa della ripetibilità (che esprime la variabilità di risultati analitici indipendenti ottenuti dallo stesso operatore utilizzando la stessa apparecchiatura nelle stesse condizioni sullo stesso campione d'analisi e a breve distanza di tempo) non deve superare il 2 % in valore relativo. La differenza relativa tra i risultati di due determinazioni ottenute in queste condizioni non deve essere superiore al 6 % della media aritmetica dei risultati.

9.2. Riproducibilità

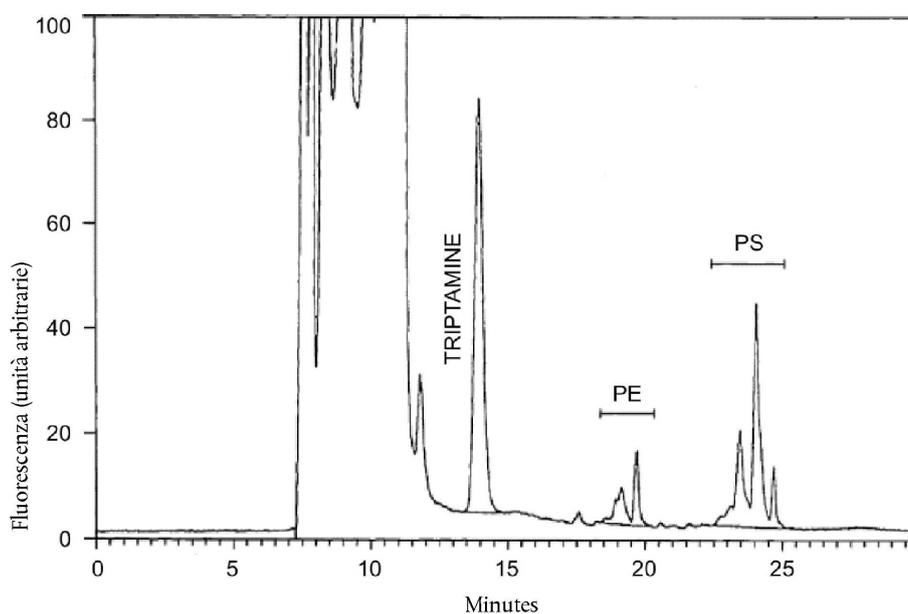
La differenza relativa tra i risultati di due determinazioni ottenute da operatori di differenti laboratori utilizzando apparecchiature differenti in differenti condizioni per l'analisi dello stesso campione non deve essere maggiore dell'11 % della media aritmetica dei risultati.

10. BIBLIOGRAFIA

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids." *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 39,395 (1988).

Figura 1

Diagramma HPLC di derivati OPA della fosfatidilserina (PS) e della fosfatidiletanolamina (PE) in estratto metanolico di latte scremato in polvere ricostituito. È riportato il modo di integrazione dei picchi di PS, PE e triptamina (standard interno)



Appendice II

RICERCA DEL LATTOSIERO PRESAMICO NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE DESTINATO ALL'AMMASSO PUBBLICO ATTRAVERSO IL DOSAGGIO DEI CASEINOMACROPEPTIDI MEDIANTE IL METODO PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo permette di evidenziare la presenza di lattosiero presamico nel latte scremato in polvere destinato all'ammasso pubblico attraverso il dosaggio dei caseinomacropeptidi.

2. RIFERIMENTO

Norma internazionale ISO 707 - Latte e prodotti lattieri – Orientamenti in materia di campionamento.

3. DEFINIZIONE

Il contenuto di siero di latte presamico in polvere è espresso come percentuale di massa, determinato mediante il contenuto di caseinomacropeptidi secondo il metodo in appresso descritto.

4. PRINCIPIO

- Ricostituzione del latte scremato in polvere in acqua calda, eliminazione dei grassi e delle proteine con acido tricloroacetico, centrifugazione o filtrazione.
- Determinazione della quantità di caseinomacropeptidi (CMP) presente nel surnatante mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).
- Valutazione del risultato ottenuto in confronto con campioni di riferimento costituiti da latte scremato in polvere esente o addizionato di una percentuale nota di lattosiero in polvere.

5. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua da impiegare deve essere acqua distillata o acqua di purezza almeno equivalente.

5.1. **Soluzione di acido tricloroacetico**

Sciogliere in acqua 240 g di acido tricloroacetico (CCl_3COOH) e portare a 1 000 ml. La soluzione deve essere chiara e incolore.

5.2. **Soluzione eluente a pH 6,0**

Sciogliere 1,74 g di fosfato dipotassico (K_2HPO_4), 12,37 g di fosfato monopotassico (KH_2PO_4) e 21,41 g di solfato di sodio (Na_2SO_4) in 700 ml d'acqua circa. Se necessario, regolare a pH 6,0 mediante una soluzione di acido fosforico o di idrossido di potassio.

Portare a 1 000 ml con acqua e miscelare.

Nota: La composizione dell'eluente può essere aggiornata per rispettare il certificato delle norme o le raccomandazioni del fabbricante del materiale di confezione della colonna.

Prima dell'impiego, filtrare la soluzione eluente su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 μm .

5.3. **Soluzione di lavaggio**

Miscelare 1 volume di acetonitrile (CH_3CN) con 9 volumi d'acqua. Prima dell'utilizzazione, filtrare la miscela su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 μm .

Nota: Può essere impiegata qualsiasi altra soluzione di lavaggio dotata di effetto battericida e tale da non alterare l'efficacia di risoluzione delle colonne.

5.4. **Campioni di riferimento**

5.4.1. *Latte scremato in polvere rispondente alle esigenze del presente regolamento, indicato in seguito con [0].*

5.4.2. *Lo stesso latte, sofisticato al 5 % (m/m) con lattosiero in polvere di tipo presamico di composizione media, indicato in seguito con [5].*

6. APPARECCHIATURA
- 6.1. **Bilancia analitica**
- 6.2. **Centrifuga (facoltativa) capace di raggiungere 2 200 g e fornita di provette a tappo della capacità di 50 ml circa**
- 6.3. **Agitatore meccanico**
- 6.4. **Agitatore magnetico**
- 6.5. **Imbuti in vetro del diametro di 7 cm circa**
- 6.6. **Dischi di carta da filtro (porosità media) del diametro di 12,5 cm circa**
- 6.7. **Dispositivo di filtrazione in vetro provvisto di membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 µm**
- 6.8. **Pipette graduate capaci di erogare 10 ml (norma ISO 648, classe A o ISO/R 835) oppure un sistema capace di erogare 10,0 ml in due minuti**
- 6.9. **Sistema erogatore capace di erogare 20,0 ml di acqua a ca. 50 °C**
- 6.10. **Bagnomaria, termostato a 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **Apparecchiatura HPLC comprendente:**
 - 6.11.1. *pompa;*
 - 6.11.2. *iniettore, manuale o automatico, da 15 a 30 µl di capacità;*
 - 6.11.3. *due colonne in serie TSK 2 000-SW (lunghezza 30 cm, diametro interno 0,75 cm) o colonne di pari efficacia (es. colonna singola TSK 2 000-SWxl, colonna singola Agilent Technologies Zorbax GF 250) ed una precolonna a monte (3 cm × 0,3 cm), caricata con I 125 o con un materiale di pari efficacia;*
 - 6.11.4. *forno a colonna, termostato a 35 ± 1 °C;*
 - 6.11.5. *rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile, capace di effettuare misure a 205 nm con la sensibilità di 0,008 Å;*
 - 6.11.6. *integratore capace di misurare l'altezza dei picchi da valle a valle.*

Nota: Si può lavorare mantenendo le colonne a temperatura ambiente, ma il potere di risoluzione risulta leggermente più basso. In questo caso, le variazioni di temperatura nel corso di una stessa serie di analisi devono essere inferiori a ± 5 °C.

7. CAMPIONAMENTO
- 7.1. Il prelievo dei campioni si effettua in base alla procedura prevista dalla norma internazionale ISO 707. Gli Stati membri possono tuttavia impiegare un altro metodo di campionamento purché conforme ai principi della succitata norma.
- 7.2. Conservare il campione in condizioni tali da non consentire alcun deterioramento o modifica di composizione.
8. PROCEDIMENTO
- 8.1. **Preparazione del campione da analizzare**

Travasare la polvere in un recipiente di capacità all'incirca doppia del volume della polvere, provvisto di un coperchio impermeabile all'aria. Chiudere immediatamente il recipiente. Mescolare bene il latte in polvere capovolgendo più volte il recipiente.
- 8.2. **Aliquota da analizzare**

In una provetta da centrifuga (6.2) o in una bottiglia chiusa idonea (50 ml) pesare 2,000 g del campione con l'approssimazione di 0,001 g.
- 8.3. **Eliminazione dei grassi e delle proteine**
 - 8.3.1. *Aggiungere all'aliquota da analizzare 20,0 ml di acqua calda (50 °C). Sciogliere la polvere agitando per 5 minuti con l'agitatore (6.3). Mettere la provetta a bagnomaria (6.10) fino a raggiungere i 25 °C.*

8.3.2. *Lavorando sotto agitazione magnetica (6.4), aggiungere 10,0 ml della soluzione di acido tricloroacetico (5.1) a ca. 25 °C in 2 minuti. Collocare la provetta nel bagnomaria (6.10) e mantenervela per 60 minuti.*

8.3.3. *Centrifugare (6.2) a 2 200 g per 10 minuti, oppure filtrare su carta (6.6), eliminando i primi 5 ml di filtrato.*

8.4. **Determinazione cromatografica**

8.4.1. *Iniettare nell'apparecchio HPLC (6.11) da 15 a 30 µl del surnatante o del filtrato (8.3.3), misurati esattamente, mantenendo la velocità di flusso della soluzione eluente (5.2) sul valore di 1,0 ml/minuto.*

Nota 1: Si può usare un'altra velocità di flusso in funzione del diametro interno delle colonne usate o delle istruzioni del fabbricante della colonna.

Nota 2: Al momento di ogni interruzione, risciacquare le colonne con acqua. Non lasciarle mai sotto la soluzione eluente (5.2).

Prima di ogni interruzione superiore a 24 ore, risciacquare le colonne con acqua, poi lavarle con la soluzione (5.3) per almeno 3 ore, alla velocità di 0,2 ml/minuto.

8.4.2. *I risultati dell'analisi cromatografica del campione in esame [E] sono ottenuti sotto forma di cromatogramma in cui ogni picco è identificato dal suo tempo di ritenzione RT, vale a dire:*

Picco II:	secondo picco del cromatogramma, con RT uguale a 12,5 minuti circa.
Picco III:	terzo picco del cromatogramma, corrispondente ai CMP, con RT uguale a 15,5 minuti.

La scelta delle colonne può influire notevolmente sui tempi di ritenzione dei vari picchi.

L'integratore (6.11.6) calcola automaticamente la superficie A di ogni picco:

A_{II} :	superficie del picco II
A_{III} :	superficie del picco III

Per rilevare le eventuali anomalie dovute a un cattivo funzionamento dell'apparecchiatura o delle colonne, oppure all'origine e alla natura del campione analizzato, è necessario osservare l'aspetto di ogni cromatogramma prima di qualsiasi interpretazione quantitativa.

In caso di dubbio, ripetere l'analisi.

8.5. **Taratura**

8.5.1. *Applicare esattamente ai campioni di riferimento (5.4) il modo di operare descritto dal punto 8.2 al punto 8.4.2.*

Utilizzare soluzioni preparate di recente, in quanto, in presenza di tricloroacetico all'8 %, i CMP si degradano (alla temperatura di 30 °C, difatti, la loro concentrazione diminuisce dello 0,2 % circa ogni ora).

8.5.2. *Prima di procedere a qualsiasi determinazione cromatografica sui campioni, condizionare le colonne iniettando ripetutamente la soluzione (8.5.1) del campione di riferimento (5.4.2), finché la superficie e il tempo di ritenzione del picco corrispondente ai CMP risultino costanti.*

8.5.3. *Determinare i coefficienti di risposta R iniettando volumi di filtrati (8.5.1) uguali a quelli utilizzati per i campioni.*

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

9.1. **Metodo di calcolo e formule**

9.1.1. *Calcolo dei coefficienti di risposta R:*

Picco II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$
-----------	----------------------------

dove:

R_{II} = coefficiente di risposta del picco II,

$A_{II} [0]$ = le superfici dei picchi II del campione di riferimento [0] ottenute in 8.5.3.

Picco III:	$R_{III} = W / (A_{III}[5] - A_{III}[0])$
------------	---

dove:

- R_{III} = coefficiente di risposta del picco III,
 $A_{III}[0]$ and $A_{III}[5]$ = le superfici del picco III nei campioni di riferimento [0] e [5] rispettivamente ottenute in 8.5.3,
 W = quantità di lattosiero presente nel campione di riferimento [5], cioè 5.

9.1.2. *Calcolo della superficie relativa dei picchi del campione [E]:*

$$S_{II}[E] = R_{II} \times A_{II}[E]$$

$$S_{III}[E] = R_{III} \times A_{III}[E]$$

$$S_{IV}[E] = R_{IV} \times A_{IV}[E]$$

dove:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = superfici relative, rispettivamente dei picchi II, III e IV nel campione [E],
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = superfici rispettivamente dei picchi II e III nel campione [E], ottenute in 8.4.2,
 R_{II} , R_{III} = coefficienti di risposta calcolati in 9.1.1.

9.1.3. *Calcolo del tempo di ritenzione relativo del picco III del campione [E]:*

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E]) / (RT_{III}[5])$$

dove:

- $RRT_{III}[E]$ = tempo di ritenzione relativo del picco III del campione [E],
 $RT_{III}[E]$ = tempo di ritenzione del picco III del campione [E] ottenuto in 8.4.2,
 $RT_{III}[5]$ = tempo di ritenzione del picco III del campione di controllo [5] ottenuto in 8.5.3.

9.1.4. *È stata sperimentalmente dimostrata l'esistenza di una relazione lineare fra il tempo di ritenzione relativo del picco III, cioè $RRT_{III}[E]$, e la percentuale di lattosiero in polvere aggiunto fino al 10 %:*

- $RRT_{III}[E] < 1,000$ se il contenuto di lattosiero è $> 5\%$,
 — $RRT_{III}[E] \geq 1,000$ se il contenuto di lattosiero è $\leq 5\%$.

L'incertezza ammessa per i valori di RRT_{III} è $\pm 0,002$.

Di norma il valore di $RRT_{III}[0]$ è poco diverso da 1,034. Secondo lo stato delle colonne, esso può avvicinarsi a 1,000, restando tuttavia sempre superiore.

9.2. **Calcolo della percentuale di lattosiero presamico in polvere contenuto nel campione:**

$$W = S_{III}[E] - [1,3 + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

dove:

- W = percentuale m/m di lattosiero presamico contenuto nel campione [E],
 $S_{III}[E]$ = superficie relativa del picco III del campione da analizzare [E] ottenuto in 9.1.2,
 1,3 = superficie relativa media del picco III, espressa in grammi di lattosiero presamico per 100 g determinato in latte scremato in polvere non sofisticato di diversa origine. Questa cifra è stata ottenuta sperimentalmente,
 $S_{III}[0]$ = superficie relativa del picco III, che è uguale a $R_{III} \times A_{III}[0]$. Tali valori sono ottenuti rispettivamente nei punti 9.1.1 e 8.5.3,
 $(S_{III}[0] - 0,9)$ = correzione da apportare alla superficie relativa media 1,3 quando il valore $S_{III}[0]$ è diverso da 0,9. Sperimentalmente la superficie relativa media del picco III del campione di controllo [0] è di 0,9.

9.3. Precisione del metodo

9.3.1. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o a breve distanza di tempo dallo stesso analista, impiegando la stessa apparecchiatura e sulla stessa aliquota di campione non deve superare lo 0,2 % m/m.

9.3.2. Riproducibilità

La differenza tra due risultati individuali ed indipendenti ottenuti in due laboratori diversi sulla stessa aliquota di campione, non deve superare lo 0,4 % m/m.

9.4. Interpretazione

9.4.1. È possibile concludere per l'assenza di lattosiero se la superficie relativa del picco III, S_{III} [E], espressa in g di lattosiero presamico per 100 g di prodotto, è $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$

dove:

2,0	è il valore massimo ammesso per la superficie relativa del picco III, che tiene conto della superficie media relativa del picco III, ossia 1,3, dell'incertezza dovuta alle variazioni di composizione del latte scremato in polvere e della riproducibilità del metodo (9.3.2),
$(S_{III}[0] - 0,9)$	è la correzione da apportare quando il valore $S_{III}[0]$ è diverso da 0,9 (cfr. punto 9.2).

9.4.2. Se la superficie relativa del picco III, S_{III} [E] è $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ e la superficie relativa del picco II, S_{II} [E], è ≤ 160 , determinare il tenore di lattosiero presamico presente nel modo indicato al punto 9.2.

9.4.3. Se la superficie relativa del picco III, S_{III} [E] è $>$ di $2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ e la superficie relativa del picco II, S_{II} [E], è ≤ 160 , determinare il tenore di proteine totale (P %); in seguito esaminare i grafici 1 e 2.

9.4.3.1. I dati ottenuti dall'analisi di campioni di latte scremato in polvere non sofisticato che presentano un tenore elevato di proteine totale sono riportati nei grafici 1 e 2.

La retta continua rappresenta la retta di regressione lineare i cui coefficienti sono calcolati con il metodo dei minimi quadrati.

La retta tratteggiata indica il limite superiore della superficie relativa del picco III, con una probabilità del 90 % di non essere superata.

Le equazioni delle rette tratteggiate dei grafici 1 e 2 sono, rispettivamente, uguali a:

$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7$	(grafico 1)
$S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93$	(grafico 2)

dove:

S_{III} è la superficie relativa del picco III, calcolata in base al tenore di proteine totali o in base alla superficie relativa del picco S_{II} [E],

P % è il tenore di proteine totali espresso in percentuale in peso,

S_{II} [E] è la superficie relativa del campione, calcolata come indicato nel punto 9.1.2.

Queste equazioni sono equivalenti a 1,3, valore menzionato al punto 9.2.

Lo scarto (T_1 e T_2) tra la superficie relativa S_{III} [E] osservata e la superficie relativa S_{III} si ricava dalle seguenti relazioni: $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$; $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

9.4.3.2 Se T_1 e/o T_2 sono inferiori o uguali a zero, non si può concludere che è presente lattosiero presamico.

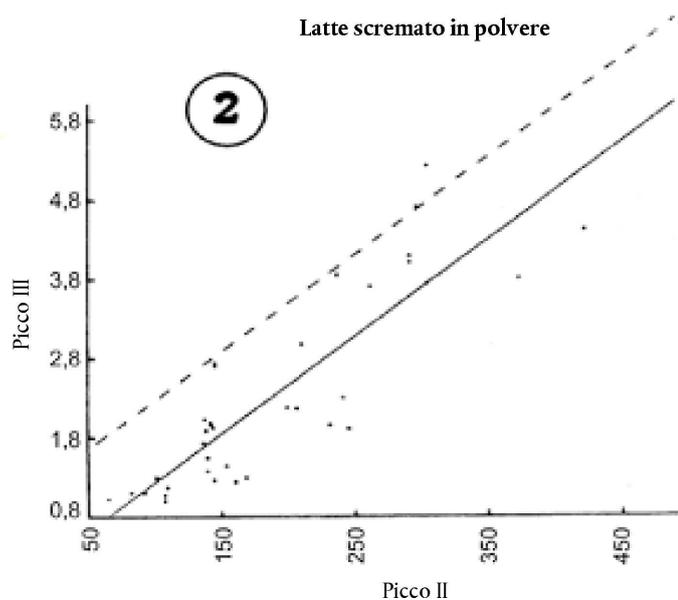
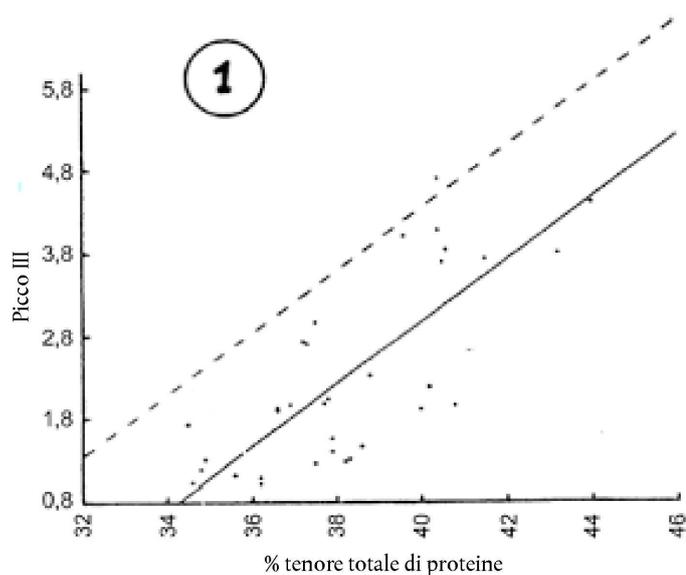
Se T_1 e T_2 sono superiori a zero, si può concludere che è presente lattosiero presamico.

Il tenore di lattosiero presente è calcolato utilizzando la formula seguente: $W = T_2 + 0,91$

dove:

0,91 rappresenta lo scarto sull'asse verticale tra la retta continua e la retta tratteggiata.

Latte scremato in polvere



Appendice III

DETERMINAZIONE DEL LATTOSIERO PRESAMICO IN POLVERE NEL LATTE SCREMATO IN POLVERE

1. OGGETTO: RICERCA DELL'AGGIUNTA DI SIERO DI LATTE PRESAMICO IN POLVERE AL LATTE SCREMATO IN POLVERE
2. RIFERIMENTI: NORMA INTERNAZIONALE ISO 707

3. DEFINIZIONE

Il contenuto di siero di latte presamico in polvere è espresso come percentuale di massa, determinato mediante il contenuto di caseinomacropetidi secondo il metodo in appresso descritto.

4. PRINCIPIO

I campioni sono analizzati ai fini della ricerca del caseinomacropetide A mediante il metodo per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) in fase inversa. Valutazione del risultato ottenuto in confronto con campioni di riferimento costituiti da latte scremato in polvere esente o addizionato di una percentuale nota di siero di latte in polvere. I risultati superiori all'1 % (m/m) mostrano la presenza di polvere di siero di latte presamico.

5. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua da impiegare deve essere acqua distillata o acqua di purezza almeno equivalente. L'acetonitrile deve essere di qualità spettroscopica o HPLC.

- 5.1. **Soluzione di acido tricloroacetico**

Sciogliere in acqua 240 g di acido tricloroacetico (CCl_3COOH) e portare a 1 000 ml.

- 5.2. **Eluenti A e B**

Eluente A: in un pallone da 1 000 ml porre 150 ml di acetonitrile (CH_3CN), 20 ml di isopropanolo ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) e 1,00 ml di acido trifluoroacetico (TFA, CF_3COOH) e portare al volume di 1 000 ml con acqua.

Eluente B: in un pallone da 1 000 ml porre 550 ml di acetonitrile, 20 ml di isopropanolo e 1,00 ml di TFA e portare al volume di 1 000 ml con acqua. Prima dell'impiego, filtrare la soluzione eluente su membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 μm .

- 5.3. **Conservazione della colonna**

Dopo le analisi la colonna viene lavata con l'eluente B (con gradiente) e successivamente con acetonitrile (con gradiente per 30 minuti). La colonna è conservata in acetonitrile.

- 5.4. **Campioni di riferimento**

- 5.4.1. *Latte scremato in polvere rispondente ai requisiti previsti per l'ammasso pubblico, indicato in appresso con [0].*
- 5.4.2. *Lo stesso latte, sofisticato al 5 % (m/m) con lattosiero in polvere di tipo presamico di composizione media, indicato in seguito con [5].*
- 5.4.3. *Lo stesso latte, sofisticato al 50 % (m/m) con lattosiero in polvere di tipo presamico di composizione media, indicato in seguito con [50].*

6. APPARECCHIATURA

- 6.1. **Bilancia analitica**

- 6.2. **Centrifuga (facoltativa) capace di raggiungere 2 200 g e fornita di provette a tappo della capacità di 50 ml circa**

- 6.3. **Agitatore meccanico**

- 6.4. **Agitatore magnetico**

- 6.5. **Imbuti in vetro del diametro di 7 cm circa**

- 6.6. **Dischi di carta da filtro (porosità media) del diametro di 12,5 cm circa**
- 6.7. **Dispositivo di filtrazione in vetro provvisto di membrana filtrante con pori del diametro di 0,45 µm**
- 6.8. **Pipette graduate capaci di erogare 10 ml (norma ISO 648, classe A o ISO/R 835) oppure un sistema capace di erogare 10,0 ml in due minuti**
- 6.9. **Sistema erogatore capace di erogare 20,0 ml di acqua a ca. 50 °C**
- 6.10. **Bagnomaria, termostato a 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **Apparecchiatura HPLC comprendente:**
 - 6.11.1. *sistema di pompaggio a gradiente binario;*
 - 6.11.2. *iniettore manuale o automatico da 100 µl di capacità;*
 - 6.11.3. *colonna Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (lunghezza 25 cm × diametro interno 0,46 cm) o una colonna equivalente per fase inversa a base di silice a pori larghi;*
 - 6.11.4. *forno a colonna, termostato a 35 ± 1 °C;*
 - 6.11.5. *rilevatore UV a lunghezza d'onda variabile, capace di effettuare misure fino a 210 nm (se necessario si può utilizzare una lunghezza d'onda superiore, fino a 220 nm), con la sensibilità di 0,02 Å;*
 - 6.11.6. *integratore capace di impostare l'integrazione o sulla linea di base o da valle a valle.*

Nota: È possibile far funzionare la colonna a temperatura ambiente purché tale temperatura non abbia fluttuazioni superiori ad 1 °C, altrimenti il tempo di ritenzione del CMP_A sarebbe soggetto a variazioni troppo grandi.

7. CAMPIONAMENTO

- 7.1. **Il prelievo dei campioni si effettua in base alla procedura prevista dalla norma internazionale ISO 707. Gli Stati membri possono tuttavia impiegare un altro metodo di campionamento purché conforme ai principi della succitata norma.**
- 7.2. **Conservare il campione in condizioni tali da non consentire alcun deterioramento o modifica di composizione.**

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del campione da analizzare

Trasversare la polvere in un recipiente di capacità all'incirca doppia del volume della polvere, provvisto di un coperchio impermeabile all'aria. Chiudere immediatamente il recipiente. Mescolare bene il latte in polvere capovolgendo più volte il recipiente.

8.2. Aliquota da analizzare

In una provetta da centrifuga (6.2) o in una bottiglia chiusa idonea (50 ml) pesare 2,00 g del campione con l'approssimazione di 0,001 g.

Nota: Nel caso delle miscele, pesare una porzione dell'aliquota da analizzare in modo che la porzione sgrassata del campione corrisponda a 2,00 g.

8.3. Eliminazione dei grassi e delle proteine

- 8.3.1. *Aggiungere all'aliquota da analizzare 20,0 ml di acqua calda (50 °C). Sciogliere la polvere agitando per 5 minuti con l'agitatore meccanico (6.3). Mettere la provetta a bagnomaria (6.10) fino a raggiungere i 25 °C.*
- 8.3.2. *Aggiungere 10,0 ml di soluzione di acido tricloroacetico a ca. 25 °C (5.1) senza interruzione per 2 minuti, agitando vigorosamente con l'agitatore magnetico (6.4). Collocare la provetta nel bagnomaria (6.10) e mantenerla per 60 minuti.*
- 8.3.3. *Centrifugare a 2 200 g (6.2) per 10 minuti oppure filtrare su carta (6.6), eliminando i primi 5 ml di filtrato.*

8.4. Determinazione cromatografica

8.4.1. Il metodo HPLC in fase inversa esclude la possibilità di falsi positivi a causa della presenza di latticello acido in polvere.

8.4.2. Prima di eseguire l'analisi HPLC in fase inversa andranno ottimizzate le condizioni del gradiente. Un tempo di ritenzione di 26 minuti \pm 2 minuti per il CMP_A è ottimale per i sistemi a gradiente con un volume morto di circa 6 ml (volume dal punto in cui i solventi confluiscono sino al volume del circuito dell'iniettore compreso). Per i sistemi a gradiente con un volume morto inferiore (ad esempio 2 ml) si deve utilizzare come tempo ottimale di ritenzione un tempo di 22 minuti.

Prendere soluzioni dei campioni di riferimento (5.4) con e senza lattosiero presamico al 50 %.

Iniettare 100 μ l del surnatante o del filtrato (8.3.3) nell'apparecchiatura HPLC operante alle condizioni di gradiente di esplorazione date nella tabella 1.

Tabella 1

Condizioni del gradiente di esplorazione per l'ottimizzazione della cromatografia

Tempo (min)	Flusso (ml/min)	% A	% B	Curva
Iniziale	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

Confrontando i due cromatogrammi si dovrebbe individuare il picco del CMP_A .

Utilizzando la formula che segue si può calcolare la composizione del solvente iniziale da utilizzare per il gradiente normale (secondo 8.4.3):

$$\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 30 / 27$$

$$\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 1,11$$

dove:

RT_{cmpA} : tempo di ritenzione del CMP_A nel gradiente di esplorazione

10: la % B iniziale del gradiente di esplorazione

2,5: la % B al punto intermedio meno la % B al punto iniziale nel gradiente normale

13,5: tempo del punto intermedio del gradiente di esplorazione

26: tempo di ritenzione necessario del CMP_A

6: rapporto dei coefficienti di direzione del gradiente di esplorazione e del gradiente normale

30: la % B al punto iniziale meno la % B a 27 minuti nel gradiente di esplorazione

27: tempo di operazione del gradiente di esplorazione

8.4.3. Prendere soluzioni dei campioni da analizzare

Iniettare nell'apparecchio HPLC 100 μ l del surnatante o del filtrato (8.3.3) misurati esattamente, mantenendo la velocità di flusso della soluzione eluente (5.2) sul valore di 1,0 ml/minuto.

La composizione dell'eluente all'inizio dell'analisi si ottiene da 8.4.2. Normalmente essa è prossima ad A: B = 76:24 (5.2). Subito dopo l'iniezione viene avviato un gradiente lineare che dopo 27 minuti porta ad una percentuale di B maggiore del 5 %. Successivamente viene avviato un gradiente lineare che in 5 minuti porta la composizione dell'eluente a 90 % B. Questa composizione viene mantenuta per 5 minuti, dopo di che con un gradiente lineare la composizione cambia e torna in 5 minuti a quella iniziale. Sulla base del volume interno del sistema di pompaggio l'iniezione successiva può essere effettuata 15 minuti dopo aver raggiunto le condizioni iniziali.

Nota 1: Il tempo di ritenzione del CMP_A deve essere di 26 minuti \pm 2 minuti. Esso può essere ottenuto variando le condizioni iniziali e finali del primo gradiente. Tuttavia la differenza nella % B per quanto riguarda le condizioni iniziali e finali del primo gradiente deve rimanere del 5 % B.

Nota 2: Gli eluenti devono essere adeguatamente degassati e restare tali. Ciò è essenziale per il corretto funzionamento del sistema di pompaggio del gradiente. La deviazione standard per il tempo di ritenzione del picco CMP_A deve essere inferiore a 0,1 minuto ($n = 10$).

Nota 3: Ogni 5 campioni è necessario iniettare il campione di riferimento [5] da utilizzare per calcolare un nuovo coefficiente di risposta R (9.1.1).

- 8.4.4. *I risultati dell'analisi cromatografica del campione da analizzare [E] sono ottenuti sotto forma di un cromatogramma in cui il picco CMP_A è identificato dal suo tempo di ritenzione che è di circa 26 minuti.*

L'integratore (6.11.6) calcola automaticamente l'altezza di picco H del picco CMP_A . In ogni cromatogramma si deve controllare la posizione della linea di base. Se la linea di base non è correttamente localizzata occorre ripetere l'analisi o l'integrazione.

Nota: Se il picco CMP_A è separato sufficientemente dagli altri picchi occorre usare il metodo dell'integrazione attraverso l'assegnazione della linea di base da valle a valle; altrimenti tracciare linee perpendicolari ad una linea di base comune, il cui punto di partenza deve essere vicino al picco CMP_A (ma non a $t = 0$ min!). Usare lo stesso tipo di integratore per lo standard di riferimento e i campioni e, nel caso di una linea di base comune, verificarne la coerenza per i campioni e lo standard di riferimento.

Prima di procedere all'interpretazione quantitativa è necessario esaminare l'aspetto di ciascun cromatogramma al fine di individuare anomalie dovute al cattivo funzionamento dell'apparecchio o della colonna, oppure all'origine e alla natura del campione analizzato. In caso di dubbio, ripetere l'analisi.

8.5. Taratura

- 8.5.1. *Applicare esattamente ai campioni di riferimento (5.4.1-5.4.2) il modo di operare descritto dal punto 8.2 al punto 8.4.4. Utilizzare soluzioni preparate di recente, in quanto a temperatura ambiente il CMP si degrada in ambiente tricloroacetico all'8 %. A 4 °C la soluzione rimane stabile per 24 ore. Nel caso si debba procedere a lunghe serie di analisi è opportuno l'impiego, nell'iniettore automatico, di una vaschetta raffreddata per il campione.*

Nota: 8.4.2. può essere omesso se la % B alle condizioni iniziali è nota da analisi precedenti.

Il cromatogramma del campione di riferimento [5] dovrebbe essere analogo alla figura 1. In questa figura il picco CMP_A è preceduto da due piccoli picchi. È essenziale ottenere una separazione analoga.

- 8.5.2. *Prima di procedere alla determinazione cromatografica dei campioni iniettare 100 µl del campione di riferimento senza lattosiero presamico [0] (5.4.1).*

Nel cromatogramma non si deve vedere un picco al tempo di ritenzione del picco CMP_A .

- 8.5.3. *Determinare i coefficienti di risposta R iniettando un volume di filtrato (8.5.1) pari a quello utilizzato per i campioni.*

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

9.1. Metodo di calcolo e formule

- 9.1.1. *Calcolo del coefficiente di risposta R:*

$$\text{Picco } CMP_A: R = W/H$$

dove:

R = coefficiente di risposta del picco CMP_A

H = altezza del picco CMP_A

W = quantità di lattosiero presente nel campione di riferimento [5]

9.2. Calcolo della percentuale di lattosiero presamico in polvere contenuto nel campione:

$$W(E) = R \times H(E)$$

dove:

W (E) = percentuale m/m di lattosiero presamico contenuto nel campione [E]

R = coefficiente di risposta del picco CMP_A (9.1.1)

H(E) = altezza del picco CMP_A del campione [E]

Se W[E] è maggiore dell'1 % e la differenza fra il tempo di ritenzione e quello del campione di riferimento [5] è inferiore a 0,2 minuti, è presente lattosiero presamico in polvere.

9.3. Precisione del metodo

9.3.1. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o a breve distanza di tempo dallo stesso analista, impiegando la stessa apparecchiatura e sulla stessa aliquota di campione non deve superare lo 0,2 % m/m.

9.3.2. Riproducibilità

Non determinata.

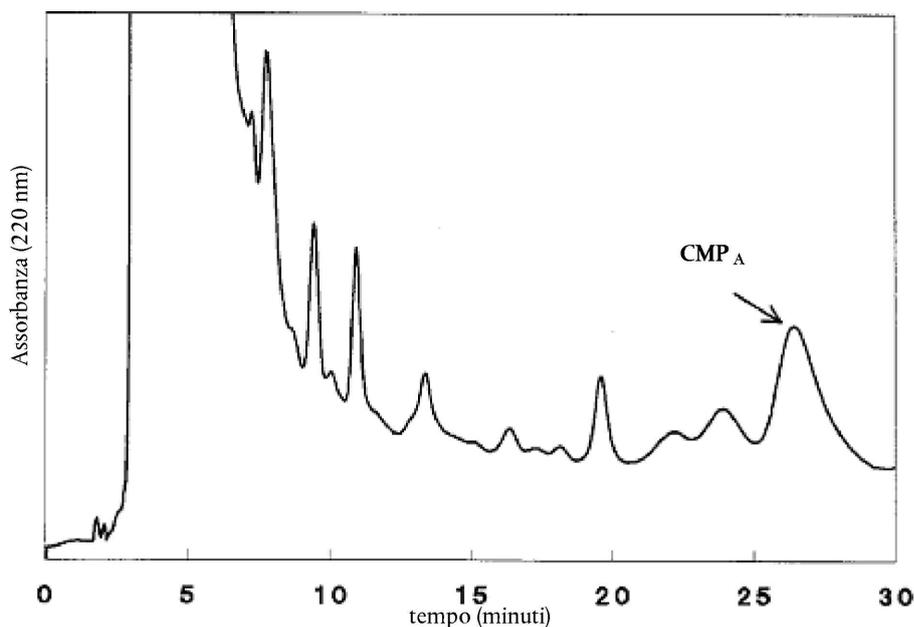
9.3.3. Linearità

Dallo 0 al 16 % di lattosiero presamico si deve ottenere una relazione lineare con un coefficiente di correlazione > 0,99.

9.4. Interpretazione

Il limite del 1 % tiene conto dell'incertezza dovuta alla riproducibilità.

Figura 1
Ni—4.6 standard



(*) Norma internazionale FIL 135B/1991. Latte e prodotti lattiero-caseari. Caratteristiche di precisione dei metodi di analisi. Descrizione di un metodo di studio in collaborazione.»;

3) sono aggiunti i seguenti allegati:

«ALLEGATO VI

Metodi di analisi del burro conferito all'ammasso privato

Parametro	Metodo
Grasso ⁽¹⁾	ISO 17189 o ISO 3727 parte 3
Acqua	ISO 3727 parte 1
Materie secche non grasse (escluso il sale)	ISO 3727 parte 2
Sale	ISO 15648

⁽¹⁾ Il metodo da applicare è riconosciuto dall'organismo pagatore.

ALLEGATO VII

Metodi di analisi del latte scremato in polvere conferito all'ammasso privato

Parametro	Metodo
Grasso	ISO 1736
Proteine	ISO 8968 parte 1
Acqua	ISO 5537

ALLEGATO VIII

Metodi di analisi dei formaggi conferiti all'ammasso privato

1. Per verificare che i formaggi che devono essere prodotti esclusivamente con latte di pecora, con latte di capra o con latte di bufala oppure con miscele di latte di pecora, capra o bufala non contengano caseina di latte vaccino si applica il metodo d'analisi descritto nell'appendice.

La caseina di latte vaccino si considera presente se il contenuto di caseina di latte vaccino nel campione analizzato è pari o superiore a quello del campione di riferimento contenente l'1 % di latte vaccino descritto nell'appendice.

2. I metodi per individuare la presenza di caseina di latte vaccino nei formaggi di cui al paragrafo 1 possono essere applicati alle seguenti condizioni:
 - a) il limite di individuazione non deve essere superiore allo 0,5 %;
 - b) non si devono ottenere risultati falsamente positivi; e
 - c) la caseina di latte vaccino è individuabile con la sensibilità richiesta anche dopo i lunghi periodi di maturazione consueti in commercio.

In caso di mancato rispetto di una delle condizioni sopra elencate si ricorre al metodo descritto nell'appendice.

Appendice

METODO PER LA RIVELAZIONE DI CASEINATO E DI LATTE VACCINI IN FORMAGGI PRODOTTI CON LATTE DI PECORA, DI CAPRA O DI BUFALA O CON MISCELE DI LATTI DI PECORA, DI CAPRA E DI BUFALA

1. OGGETTO

Rivelazione di caseinato e latte vaccini in formaggi di latte di pecora, di capra o di bufala o di miscele di latti di pecora, capra e bufala mediante focalizzazione isoelettrica delle γ -caseine dopo plasminolisi.

2. CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo è idoneo per una rivelazione sensibile e specifica di latte vaccino crudo o trattato termicamente e di caseinato in formaggi freschi e stagionati di latte di pecora, di capra o di bufala o di miscele di latti di pecora, capra e bufala. Il metodo non è adatto per la rivelazione dell'adulterazione di latte e formaggi mediante concentrati di proteine del siero di latte vaccino trattate termicamente.

3. PRINCIPIO DEL METODO

3.1. **Isolamento delle caseine dal formaggio e dagli standard di riferimento.**3.2. **Solubilizzazione delle caseine isolate ed azione plasminica sulle stesse (EC.3.4.21.7).**3.3. **Focalizzazione isoelettrica delle caseine trattate con plasmina in presenza di urea e colorazione delle proteine.**3.4. **Valutazione dei profili di γ_3 - e γ_2 -caseina (prova della presenza di latte vaccino) per confronto del profilo del campione con quelli ottenuti sullo stesso gel da standard di riferimento contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino.**

4. REAGENTI

Salvo dove diversamente indicato, utilizzare solo reagenti chimici per analisi. L'acqua deve essere bidistillata o di purezza equivalente.

Nota: Le indicazioni che seguono valgono per gel di poliacrilammide preparati in laboratorio, contenenti urea, delle dimensioni di 265 × 125 × 0,25 mm. Nel caso vengano utilizzati gel di differenti dimensioni o differente tipo, può rendersi necessario modificare le condizioni di separazione.

Focalizzazione isoelettrica4.1. **Reagenti per la produzione di gel di poliacrilammide contenenti urea**4.1.1. *Soluzione madre di gel*

Sciogliere in acqua:

4,85 g di acrilammide

0,15 g N, N'-metilen-bis-acrilammide (BIS)

48,05 g di urea

15,00 g di glicerolo (87 % p/p),

e portare a 100 ml. Conservare in frigorifero in un flacone di vetro scuro.

Nota: È preferibile utilizzare una soluzione premiscelata di acrilammide/BIS, disponibile in commercio, invece dei pesi prestabiliti delle acrilammidi neurotossiche. Se una tale soluzione contiene il 30 % p/v di acrilammide e lo 0,8 % p/v di BIS, utilizzare per la formulazione un volume di 16,2 ml invece del peso prestabilito. La soluzione madre può venire conservata per un massimo di 10 giorni; se la sua conducibilità è superiore a 5 μ S, deionizzarla agitando per 30 minuti con 2 g di Amberlite MB-3, poi filtrare attraverso una membrana da 0,45 μ m.

4.1.2. Soluzione di gel

Preparare una soluzione di gel miscelando additivi e anfoliti (*) con la soluzione madre di gel (4.1.1).

9,0 ml di soluzione madre

24 mg di β -alanina

500 μ l di anfolita pH 3,5-9,5

250 μ l di anfolita pH 5-7

250 μ l di anfolita pH 6-8

Miscelare la soluzione di gel e degassarla per due o tre minuti in un bagno a ultrasuoni o sotto vuoto.

Nota: La soluzione di gel va preparata appena prima dell'uso (cfr. 6.2).

4.1.3. Soluzioni dei catalizzatori

4.1.3.1 N, N, N' N' — tetrametiletilendiammina (Temed)

4.1.3.2 Persolfato d'ammonio (PER) al 40 % p/v:

Sciogliere 800 mg di PER in acqua e portare a 2 ml.

Nota: Usare sempre soluzioni di PER appena preparate.

4.2. **Fluido di contatto**

Cherosene o paraffina liquida

4.3. **Soluzione anodica**

Sciogliere 5,77 g di acido fosforico (85 % p/p) in acqua e portare a 100 ml.

4.4. **Soluzione catodica**

Sciogliere 2 g di idrossido di sodio in acqua e portare a 100 ml con acqua.

Preparazione del campione

4.5. **Reagenti per l'isolamento delle proteine**

4.5.1. *Acido acetico diluito (25 ml di acido acetico glaciale portati a 100 ml con acqua).*

4.5.2. *Diclorometano*

4.5.3. *Acetone*

4.6. **Tampone per la solubilizzazione delle proteine**

Sciogliere in acqua:

5,75 g di glicerolo (87 % p/p),

24,03 g di urea

250 mg di ditiotreitolo

e portare al volume di 50 ml.

Nota: Conservare in frigorifero, per una settimana al massimo.

4.7. Reagenti per la scissione plasmidica delle caseine

4.7.1. Tampone di carbonato di ammonio

Titolare una soluzione di idrogenocarbonato d'ammonio a 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml di acqua) contenente 0,05 mol/l di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, 1,46 g/100 ml), con una soluzione di carbonato d'ammonio a 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml di acqua) contenente 0,05 mol/l EDTA a pH 8.

4.7.2. Plasmina bovina (EC. 3.4.21.7), attività non minore di 5 U/ml

4.7.3. Soluzione di acido ϵ -amminocapronico per l'inibizione dell'enzima

Sciogliere 2,624 g di acido ϵ -amminocapronico (acido 6-ammino-n-esanoico) in 100 ml di etanolo al 40 % (v/v).

4.8. Standard

4.8.1. Standard di riferimento certificati di una miscela di coagulo presamico a partire da latte scremato di pecora e capra contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino possono essere richiesti all'Istituto dei materiali e delle misure di riferimento della Commissione (Institute for Reference Materials and Measurements), B-2440 Geel, Belgio

4.8.2. Preparazione di standard di laboratorio provvisori di coagulo presamico di latte di bufala contenenti lo 0 % e l'1 % di latte vaccino

Il latte scremato viene preparato mediante centrifugazione di latte crudo di bufala o di vacca, a 37 °C, a 500 g per 20 minuti. Dopo aver raffreddato rapidamente a 6-8 °C la provetta e il contenuto, lo strato superiore di grasso viene completamente rimosso. Per la preparazione dello standard all'1 %, aggiungere 5 ml di latte vaccino scremato a 495 ml di latte scremato di bufala in un becher da 1 litro, regolare il pH a 6,4 aggiungendo acido lattico diluito (10 % p/v). Regolare la temperatura su 35 °C e aggiungere 100 μ l di caglio di vitello (attività 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), agitare per 1 minuto e poi lasciare a riposo il becher coperto con un foglio di alluminio a 35 °C per 1 ora per permettere la formazione della cagliata. Dopo la formazione della cagliata, liofilizzare l'intero latte coagulato, senza preventiva omogeneizzazione né drenaggio del siero. Dopo la liofilizzazione, macinare finemente fino ad ottenere una polvere omogenea. Per la preparazione dello standard allo 0 %, eseguire la stessa procedura usando latte scremato di bufala puro. Conservare gli standard a - 20 °C.

Nota: È consigliabile controllare la purezza del latte di bufala mediante focalizzazione isoelettrica delle caseine trattate con plasmina prima della preparazione degli standard.

Reagenti per la colorazione delle proteine

4.9. Fissativo

Sciogliere 150 g di acido tricloroacetico in acqua e portare a 1 000 ml.

4.10. Soluzione decolorante

Portare 500 ml di metanolo e 200 ml di acido acetico glaciale a 2 000 ml con acqua distillata.

Nota: Preparare la soluzione decolorante ogni giorno; per la preparazione si possono utilizzare soluzioni madre di metanolo al 50 % (v/v) e acido acetico glaciale al 20 % (v/v), da miscelare in volumi uguali.

4.11. Soluzioni coloranti

4.11.1. Soluzioni di colorante (soluzione madre 1)

Sciogliere 3,0 g di blu brillante Coomassie G 250 (C.I. 42655) in 1 000 ml di metanolo al 90 % (v/v) con un agitatore magnetico (circa 45 minuti), filtrare attraverso due filtri a pieghe, a velocità media.

4.11.2. Soluzioni di colorante (soluzione madre 2)

Sciogliere 5 g di solfato di rame pentaidrato in 1 000 ml di acido acetico al 20 % (v/v).

4.11.3. Soluzioni di colorante (soluzione di lavoro)

Miscelare 125 ml di ciascuna delle soluzioni madre (4.11.1, 4.11.2) appena prima della colorazione.

Nota: La soluzione colorante deve essere preparata il giorno stesso in cui viene usata.

5. APPARECCHIATURA
 - 5.1. **Lastre di vetro (265 x 125 x 4 mm); rullo di gomma (larghezza 15 cm); tavolo con piano regolabile**
 - 5.2. **Foglio di supporto del gel (265 × 125 mm)**
 - 5.3. **Foglio di copertura (280 × 125 mm). Applicare una striscia di nastro adesivo (280 × 6 × 0,25 mm) a ciascun bordo lungo (cfr. figura 1).**
 - 5.4. **Camera di elettrofocalizzazione con piastra di raffreddamento (per esempio 265 × 125 mm) e alimentazione elettrica adatta ($\geq 2,5$ kV) o dispositivo per elettroforesi automatica**
 - 5.5. **Criostato a circolazione, con regolazione termostatica su $12 \pm 0,5$ °C**
 - 5.6. **Centrifuga regolabile su 3 000 g**
 - 5.7. **Strisce elettrodiche (lunghezza ≥ 265 mm)**
 - 5.8. **Flaconi contagocce per le soluzioni anodica e catodica**
 - 5.9. **Applicatori per campioni (10 × 5 mm, viscosa o carta da filtro a scarso assorbimento di proteine)**
 - 5.10. **Vaschette di colorazione e decolorazione in acciaio inossidabile o vetro (per esempio vassoi portastrumenti da 280 × 150 mm)**
 - 5.12. **Omogeneizzatore ad asta regolabile (diametro 10 mm), velocità 8 000-20 000 g al minuto**
 - 5.13. **Agitatore magnetico**
 - 5.14. **Bagno ad ultrasuoni**
 - 5.15. **Saldatore per pellicola**
 - 5.16. **Micropipette da 25 μ l**
 - 5.17. **Concentratore sotto vuoto o liofilizzatore**
 - 5.18. **Bagnomaria a controllo termostatico regolabile su 35 e 40 ± 1 °C con agitatore**
 - 5.19. **Densitometro con lettura a $\lambda = 634$ nm**

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione del campione

6.1.1. Isolamento delle caseine

Pesare una quantità equivalente a 5 g di sostanza secca di formaggio o degli standard di riferimento in una provetta da centrifuga da 100 ml, aggiungere 60 ml di acqua distillata e omogeneizzare con un omogeneizzatore ad asta (8 000-10 000 rpm). Regolare di pH 4,6 con acido acetico diluito (4.5.1) e centrifugare (5 min, 3 000 g). Decantare il grasso e il siero, omogeneizzare il residuo a 20 000 rpm in 40 ml di acqua distillata portata a pH 4,5 con acido acetico diluito (4.5.1), aggiungere 20 ml di diclorometano (4.5.2), omogeneizzare di nuovo e centrifugare (5 min, 3 000 g). Recuperare con una spatola lo strato di caseina disposto tra la fase acquosa e la fase organica (cfr. figura 2) e separare le due fasi per decantazione. Riomogeneizzare la caseina in 40 ml di acqua distillata (cfr. sopra) e 20 ml di diclorometano (4.5.2) e centrifugare. Ripetere questo procedimento fino a quando le due fasi di estrazione diventano incolori (2 o 3 volte). Omogeneizzare il residuo proteico con 50 ml di acetone (4.5.3) e filtrare attraverso carta da filtro a pieghe di media velocità. Lavare il residuo sul filtro con due aliquote separate di acetone di 25 ml ciascuna e far essiccare all'aria o in corrente d'azoto, quindi polverizzare finemente nel mortaio.

Nota: Gli isolati di caseina secchi devono essere conservati a -20 °C.

6.1.2. Scissione plasminica delle β -caseine per intensificare le bande di γ -caseine

Disperdere 25 mg di caseine isolate (6.1.1) in 0,5 ml di tampone di carbonato d'ammonio (4.7.1) e omogeneizzare per 20 minuti, ad esempio utilizzando un trattamento ad ultrasuoni. Riscaldare a 40 °C e aggiungere 10 μ l di plasmina (4.7.2), miscelare e incubare per 1 ora a 40 °C agitando in continuazione. Per inibire l'enzima, aggiungere 20 μ l di soluzione di acido ϵ -amminocapronico (4.7.3), poi aggiungere 200 mg di urea solida e 2 mg di ditiotreitolo.

Nota: Per ottenere una maggiore simmetria nelle bande di caseina focalizzate, è consigliabile liofilizzare la soluzione dopo aver aggiunto l'acido ϵ -amminocapronico e disciolto poi i residui in 0,5 ml di tampone di solubilizzazione delle proteine (4.6).

6.2. Preparazione di gel di poliacrilammide contenenti urea

Con qualche goccia d'acqua e col rullo stendere il foglio di supporto del gel (5.2) su una lastra di vetro (5.1) rimuovendo l'acqua in eccesso con carta assorbente o con un panno. Con il rullo, stendere il foglio di copertura (5.3) con distanziatori (0,25 mm) su un'altra lastra di vetro nello stesso modo. Posare la lastra orizzontalmente su un piano a livello regolabile.

Aggiungere 10 µl di Temed (4.1.3.1) alla soluzione di gel preparata e disaerata (4.1.2), agitare e aggiungere 10 µl di soluzione di PER (4.1.3.2), miscelare accuratamente e versare immediatamente in modo regolare sul centro del foglio di copertura. Posizionare un bordo della lastra di supporto del gel (con il lato del foglio in basso) sulla lastra del foglio di copertura e abbassarla lentamente in modo che tra i fogli si formi una pellicola di gel uniforme e senza bolle (figura 3). Abbassare completamente la lastra di supporto del gel con attenzione usando una spatola sottile e porre altre tre lastre di vetro su di essa come pesi. Dopo il completamento della polimerizzazione (circa 60 minuti), rimuovere il gel polimerizzato sul foglio di supporto insieme con il foglio di copertura scostando le lastre di vetro. Pulire accuratamente il rovescio della lastra di supporto per rimuovere residui di gel e urea. Saldare il "sandwich di gel" in una pellicola tubolare e conservare in frigorifero (massimo 6 settimane).

Nota: Il foglio di copertura con i distanziatori può essere riutilizzato. Il gel di poliacrilammide può essere tagliato in porzioni più piccole, cosa raccomandata quando i campioni sono pochi o si utilizza un dispositivo automatico per elettroforesi (2 gel, dimensioni 4,5 × 5 cm).

6.3. Focalizzazione isoelettrica

Regolare il termostato di raffreddamento su 12 °C. Detergere il rovescio del foglio di supporto del gel con cherosene, poi far cadere qualche goccia di cherosene (4.2) sul centro del blocco di raffreddamento. Far ruotare su di esso il sandwich di gel con il lato del supporto verso il basso, facendo attenzione che non rimangano bolle. Detergere l'eccesso di cherosene e rimuovere il foglio di copertura. Bagnare le strisce elettrodeiche con le soluzioni elettrodeiche (4.3, 4.4), tagliarle nel senso della lunghezza del gel e posizionarle nei punti previsti (distanza tra gli elettrodi 9,5 cm).

Condizioni della focalizzazione isoelettrica

6.3.1. Dimensioni del gel: 265 × 125 × 0,25 mm

Operazione	Tempo (min.)	Tensione (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Volt/ora (Vh)
1. Prefocalizzazione	30	massimo 2 500	massimo 15	cost. 4	c. 300
2. Focalizzazione campione ⁽¹⁾	60	massimo 2 500	massimo 15	cost. 4	c. 1 000
3. Focalizzazione finale	60	massimo 2 500	massimo 5	massimo 20	c. 3 000
	40	massimo 2 500	massimo 6	massimo 20	c. 3 000
	30	massimo 2 500	massimo 7	massimo 25	c. 3 000

⁽¹⁾ Applicazione del campione: dopo la prefocalizzazione (fase 1), pipettare 18 µl di soluzioni campione e standard sugli applicatori del campione (10 × 5 mm), posizzionarli sul gel a distanze di 1 mm uno dall'altro e a 5 mm di distanza in senso longitudinale dall'anodo e premere leggermente. Eseguire la focalizzazione nelle condizioni suddette rimuovendo con attenzione gli applicatori dei campioni dopo 60 minuti di focalizzazione.

Nota: Se lo spessore o la larghezza del gel vengono modificati, i valori di corrente e potenza devono essere regolati di conseguenza (per esempio raddoppiare i valori della corrente elettrica e della potenza se si utilizza un gel a 265 × 125 × 0,5 mm).

- 6.3.2. *Esempio di un programma di tensione per un dispositivo per elettroforesi automatica (2 gel da 5,0 × 4,5 cm), elettrodi senza strisce applicate direttamente al gel*

Operazione	Tensione	Corrente	Potenza	Temp.	Volt/ora
1. Prefocalizzazione	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8°C	85 Vh
2. Focalizzazione campione	250 V	5,0 mA	2,5 W	8°C	30 Vh
3. Focalizzazione	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8°C	80 Vh
4. Focalizzazione	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8°C	570 Vh

Posizionare l'applicatore del campione nella fase 2 a 0 Vh

Rimuovere l'applicatore del campione nella fase 2 a 30 Vh

6.4. **Colorazione delle proteine**

6.4.1. *Fissaggio delle proteine*

Rimuovere le strisce elettrodiche immediatamente dopo aver interrotto l'alimentazione elettrica e porre il gel immediatamente in una bacinella di colorazione/decolorazione con 200 ml di fissativo (4.9). Lasciare per 15 minuti agitando continuamente.

6.4.2. *Lavaggio e colorazione della lastra di gel*

Eliminare accuratamente il fissativo e lavare la lastra di gel due volte per 30 secondi, ogni volta con 100 ml di soluzione decolorante (4.10). Eliminare la soluzione decolorante e riempire la bacinella con 250 ml di soluzione colorante (4.11.3); lasciar colorare per 45 minuti agitando delicatamente.

6.4.3. *Decolorazione della lastra di gel*

Eliminare la soluzione colorante, lavare due volte la lastra di gel con 100 ml di soluzione decolorante (4.10) ogni volta; agitare con 200 ml di soluzione di decolorazione per 15 minuti e ripetere l'operazione almeno due o tre volte fino a quando il fondo è chiaro e incolore. Risciacquare poi la lastra di gel con acqua distillata (2 × 2 min) e asciugare all'aria per 2 o 3 ore o con un asciugacapelli per 10-15 minuti.

Nota 1: Eseguire il fissaggio, il lavaggio, la colorazione e la decolorazione a 20 °C. Non usare temperature elevate.

Nota 2: Se si preferisce una colorazione più sensibile con argento (per esempio Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, codice n. 17-1150-01) i campioni di caseina trattata con plasmina devono essere diluiti a 5 mg/ml.

7. VALUTAZIONE

La valutazione è eseguita confrontando i profili proteici del campione sconosciuto con quello dello standard di riferimento sullo stesso gel. La presenza di latte vaccino nei formaggi di latte di pecora, di capra o di bufala e di miscele di lattini di pecora, capra e bufala, viene rivelata attraverso le γ_3 - e γ_2 -caseine, i cui punti isoelettrici sono compresi tra pH 6,5 e pH 7,5 (figure 4a, 4b e 5). Il limite di rivelazione è inferiore allo 0,5 %.

7.1. **Stima visiva**

Per una valutazione visiva della quantità di latte vaccino, è consigliabile regolare le concentrazioni dei campioni e degli standard in modo da ottenere lo stesso livello di intensità delle γ_2 - and γ_3 -caseine ovine, caprine e/o di bufala (cfr. " γ_2 E,G,B" e " γ_3 E,G,B" nelle figure 4a, 4b e 5). Dopo di ciò, la quantità di latte vaccino (minore, uguale o maggiore dell'1 %) nel campione in esame può venire valutata direttamente confrontando l'intensità delle γ_3 - e γ_2 -caseine vaccine (cfr. " γ_3 C" e " γ_2 C" nelle figure 4a, 4b e 5) con quella degli standard di riferimento allo 0 % e all'1 % (pecora, capra) o con gli standard provvisori di laboratorio (bufala).

7.2. Stima densitometrica

Se disponibile, ricorrere alla densitometria (5.19) per la determinazione del rapporto tra le aree dei picchi delle γ_2 - e γ_3 -caseine vaccine sulle γ_2 - e γ_3 -caseine ovine, caprine e/o di bufala (cfr. figura 5). Confrontare questo valore con il rapporto di area dei picchi delle γ_2 - e γ_3 -caseine dello standard di riferimento all'1 % (pecora, capra) o dello standard provvisorio di laboratorio (bufala) analizzati sullo stesso gel.

Nota: Il metodo è soddisfacente nel caso di un chiaro segnale positivo per le γ_2 - e γ_3 -caseine vaccine nello standard di riferimento all'1 %, ma non nello standard di riferimento allo 0 %. In caso contrario, ottimizzare la procedura seguendo con estrema precisione i dettagli del metodo.

Un campione è considerato positivo se entrambe le γ_2 - e γ_3 -caseine vaccine, o i corrispondenti rapporti di area dei picchi, sono uguali o maggiori del livello dello standard di riferimento all'1 %.

8. BIBLIOGRAFIA

Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).

Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).

Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).

Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

Figura 1

Disegno schematico del foglio di copertura

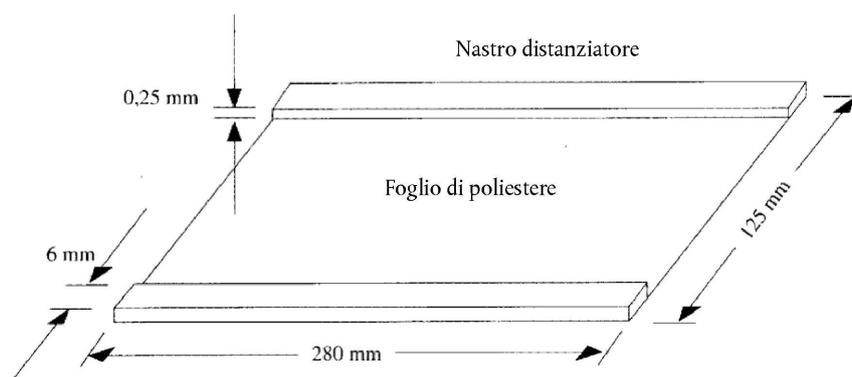


Figura 2

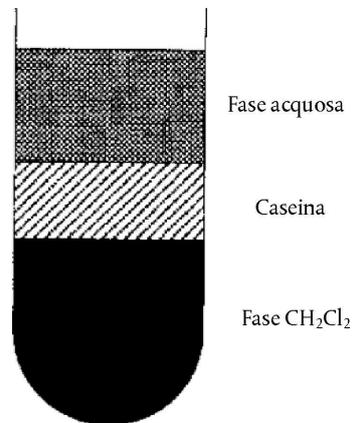
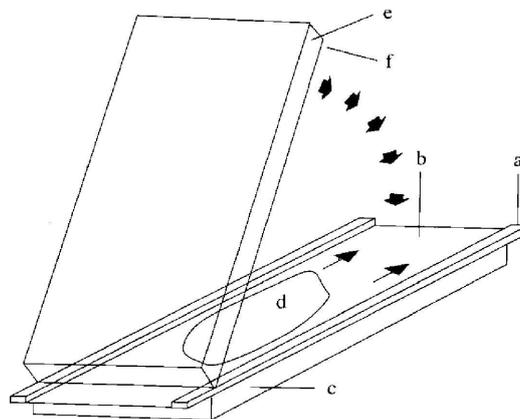
Strato di caseina sospeso tra la fase acquosa e la fase organica dopo centrifugazione

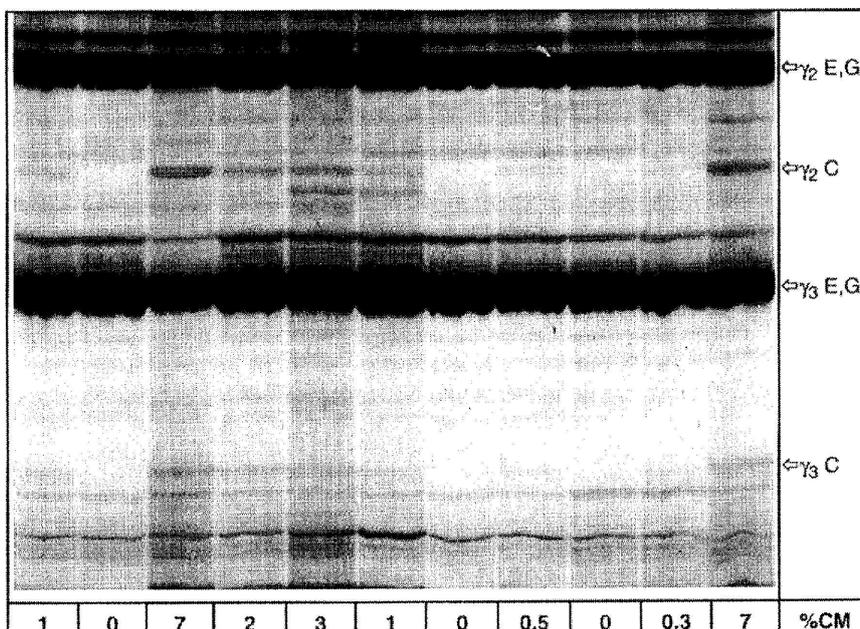
Figura 3

Tecnica per la colata di gel poliacrilammide ultrasottile

a = nastro distanziatore (0,25 mm); b = foglio di copertura (5.3); c, e = lastre di vetro (5.1); d = soluzione di gel (4.1.2); f = foglio di supporto del gel (5.2).

Figura 4a

Focalizzazione isoelettrica di caseine di formaggio di latte di pecora e capra contenente varie quantità di latte vaccino trattate con plasmina

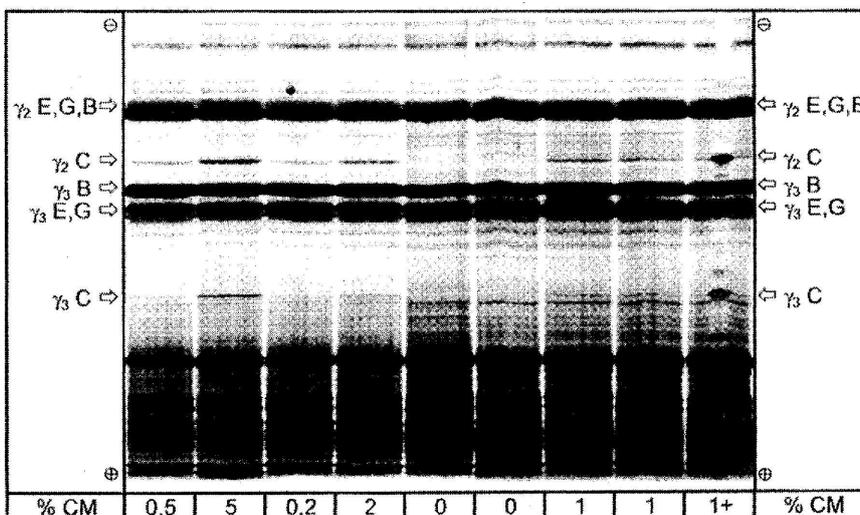


% CM = percentuali di latte vaccino, C = vacca, E = pecora, G = capra

È mostrata la metà superiore del gel IEF

Figura 4b

Focalizzazione isoelettrica di caseine, trattate con plasmina, di formaggio di miscele di latte di pecora, capra e bufala contenenti varie quantità di latte vaccino

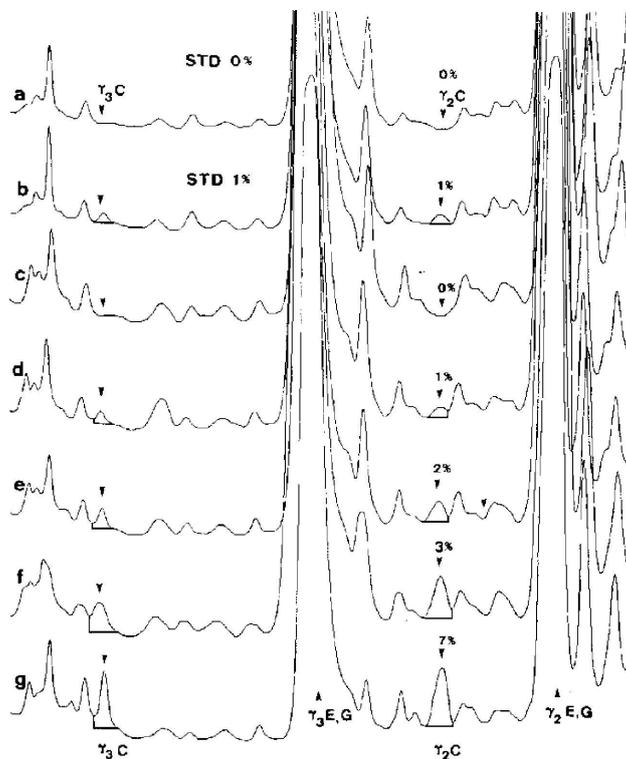


% CM = percentuali di latte vaccino; 1 + = campione contenente l'1 % di latte vaccino con aggiunta di caseina vaccina pura al centro della traccia; C = vacca, E = pecora, G = capra, B = bufala.

È mostrata la distanza totale di separazione del gel IEF.

Figura 5

Sovrapposizione dei densitogrammi di standard (STD) e di campioni di formaggio prodotto con miscele di latte di pecora e capra dopo focalizzazione isoelettrica



a,b = standard contenenti lo 0 e l'1 % di latte vaccino; c-g = campioni di formaggio contenenti lo 0, 1, 2, 3 e 7 % di latte vaccino. C = vacca, E = pecora, G = capra.

È stata analizzata la metà superiore del gel IEF a $\lambda = 634$ nm.

ALLEGATO IX

Valutazione delle analisi**1. Assicurazione qualità**

Le analisi sono eseguite da laboratori designati a norma dell'articolo 12 del regolamento (CE) n. 882/2004 (**) o designati dalle autorità competenti dello Stato membro.

2. Campionamento e contestazione dei risultati analitici

1. Si procede al campionamento in conformità alla normativa pertinente per il prodotto trattato. Se non sono espressamente previste disposizioni in materia di campionamento, si applicano le disposizioni della norma ISO 707: Latte e prodotti lattiero-caseari — Metodi di campionamento.
2. Nella relazione di laboratorio sui risultati dell'analisi figurano gli elementi atti a consentire una valutazione dei risultati conformemente all'appendice.
3. Per l'esecuzione delle analisi previste dalla normativa dell'Unione si procede al prelievo di campioni in doppio.
4. In caso di controversia sui risultati, l'organismo pagatore sottopone nuovamente il prodotto in questione alle analisi necessarie e le relative spese sono a carico della parte soccombente.

Le suddette analisi sono effettuate a condizione che siano disponibili campioni del prodotto prelevati in doppio, sigillati e conservati in modo appropriato presso l'autorità competente. Il fabbricante presenta all'organismo pagatore la richiesta di effettuare l'analisi entro 7 giorni lavorativi dalla comunicazione dei risultati della prima analisi. L'analisi è realizzata entro 21 giorni lavorativi dal ricevimento della richiesta.

5. Il risultato di questa analisi è definitivo.
 6. Se entro cinque giorni lavorativi dal campionamento il fabbricante dimostra che la procedura di campionamento non è stata correttamente eseguita, occorre, se possibile, ripetere il campionamento. Se non è possibile procedere a un nuovo campionamento, la partita è accettata.
-

Appendice

Valutazione del rispetto dei limiti regolamentari di una data partita**1. Principio**

Se la normativa in materia di intervento pubblico e di ammasso privato prevede procedure dettagliate di campionamento, si osservano tali procedure. Negli altri casi si utilizza un campione, composto di almeno 3 unità di campione, prelevato casualmente dalla partita presentata al controllo. Si può preparare un campione composito. Il risultato ottenuto si raffronta con i limiti regolamentari calcolando un intervallo di fiducia del 95 % pari al doppio della deviazione standard, dove la deviazione standard dipende da queste due ipotesi: 1) se il metodo è validato nell'ambito della cooperazione internazionale con valori definiti di σ_r e σ_R oppure 2) in caso di validazione interna, se è stato calcolato un valore di riproducibilità interna. L'intervallo di fiducia viene quindi comparato con l'incertezza di misurazione del risultato.

2. Metodo convalidato nell'ambito della collaborazione internazionale

In questo caso sono state stabilite la deviazione standard di ripetibilità σ_r e la deviazione standard di riproducibilità σ_R e il laboratorio è in grado di dimostrare l'osservanza delle caratteristiche di esecuzione del metodo validato.

Calcolare la media aritmetica \bar{x} del numero n di misurazioni ripetute.

Calcolare l'incertezza ampliata ($k = 2$) \bar{x} di come segue:

$$U = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n} \sigma_r^2}$$

Se il risultato finale x della misurazione è calcolato utilizzando una formula del tipo $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ o $x = y_1/y_2$ si seguono le procedure di combinazione delle deviazioni standard abituali in tali casi.

Si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare superiore UL se

$$\bar{x} - U > UL;$$

altrimenti si ritiene che la partita rispetti il limite superiore UL.

Si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare inferiore LL se

$$\bar{x} + U < LL;$$

altrimenti si ritiene che la partita rispetti il limite inferiore LL.

3. Validazione interna mediante calcolo della deviazione standard di riproducibilità interna

Se si utilizzano metodi non previsti dal presente regolamento e se non sono state stabilite le misure della precisione è necessario procedere ad una validazione all'interno del laboratorio. Nella formula di calcolo dell'incertezza ampliata U , anziché σ_r e rispettivamente σ_R , occorre utilizzare la deviazione standard di ripetibilità interna s_r e la deviazione standard di riproducibilità interna s_{iR} .

Le norme da seguire per determinare la conformità con il limite di legge sono quelle indicate al punto 1. Tuttavia, se si ritiene che la partita non rispetti il limite regolamentare occorre ripetere le misurazioni utilizzando il metodo specificato nel presente regolamento e il risultato deve essere valutato conformemente al punto 1.

(*) Per ottenere la separazione richiesta delle γ -caseine, si sono dimostrati particolarmente validi i prodotti Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) e Resolyte® pH 5-7 e pH 6-8 (BDH, Merck).

(**) Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (GU L 165 del 30.4.2004, pag. 1).»

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2018/151 DELLA COMMISSIONE**del 30 gennaio 2018**

recante modalità di applicazione della direttiva (UE) 2016/1148 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'ulteriore specificazione degli elementi che i fornitori di servizi digitali devono prendere in considerazione ai fini della gestione dei rischi posti alla sicurezza delle reti e dei sistemi informativi e dei parametri per determinare l'eventuale impatto rilevante di un incidente

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

vista la direttiva (UE) 2016/1148 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 6 luglio 2016, recante misure per un livello comune elevato di sicurezza delle reti e dei sistemi informativi nell'Unione ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 16, paragrafo 8,

considerando quanto segue:

- (1) Conformemente alla direttiva (UE) 2016/1148, i fornitori di servizi digitali rimangono liberi di adottare le misure tecniche e organizzative che ritengono adeguate e proporzionate alla gestione dei rischi che corre la sicurezza delle loro reti e dei loro sistemi informativi, purché tali misure garantiscano un adeguato livello di sicurezza e tengano conto degli elementi previsti da detta direttiva.
- (2) Nell'individuazione delle misure tecniche e organizzative adeguate e proporzionate, il fornitore di servizi digitali dovrebbe affrontare la questione della sicurezza informatica in modo sistematico, ricorrendo a un approccio basato sui rischi.
- (3) Al fine di garantire la sicurezza dei sistemi e degli impianti, i fornitori di servizi digitali dovrebbero effettuare procedure di valutazione e di analisi. Tali attività dovrebbero riguardare la gestione sistematica delle reti e dei sistemi informativi, la sicurezza fisica e dell'ambiente, la sicurezza delle forniture e i controlli dell'accesso.
- (4) Nello svolgimento di un'analisi dei rischi nell'ambito della gestione sistematica delle reti e dei sistemi informativi, i fornitori di servizi digitali dovrebbero essere incoraggiati a individuare i rischi specifici e a quantificarne l'importanza, ad esempio individuando le minacce alle risorse critiche e il modo in cui incidono sulle operazioni, e determinando il modo migliore per attenuare tali minacce sulla base delle capacità correnti e delle esigenze in termini di risorse.
- (5) Le politiche in materia di risorse umane potrebbero fare riferimento alla gestione delle competenze, inclusi gli aspetti connessi allo sviluppo delle competenze correlate alla sicurezza e alla sensibilizzazione. Nel decidere in merito a una serie di politiche adeguate in materia di sicurezza di funzionamento, i fornitori di servizi digitali dovrebbero essere incoraggiati a tener conto degli aspetti relativi alla gestione dei cambiamenti, alla gestione delle vulnerabilità, alla formalizzazione delle pratiche operative e amministrative e alla mappatura del sistema.
- (6) Le politiche in materia di architettura di sicurezza potrebbero comprendere in particolare la segregazione delle reti e dei sistemi, nonché misure di sicurezza specifiche per le operazioni critiche quali ad esempio le operazioni amministrative. La segregazione delle reti e dei sistemi potrebbe consentire ai fornitori di servizi digitali di distinguere elementi quali i flussi di dati e le risorse informatiche appartenenti a un cliente, a un gruppo di clienti, al fornitore di servizi digitali o a terzi.
- (7) Le misure adottate per quanto riguarda la sicurezza fisica e dell'ambiente dovrebbero garantire la protezione delle reti e dei sistemi informativi dell'organizzazione dai danni causati da incidenti quali furti, incendi, inondazioni o altre condizioni meteorologiche, problemi di telecomunicazione o interruzioni di corrente.
- (8) La sicurezza dell'erogazione, ad esempio per quanto riguarda l'energia elettrica, il combustibile o il raffreddamento, potrebbe includere la sicurezza della catena di approvvigionamento che comprende, in particolare, la sicurezza dei contraenti e subcontraenti terzi e la loro gestione. La tracciabilità delle forniture critiche si riferisce alla capacità del fornitore di servizi digitali di identificare e registrare le fonti delle forniture.
- (9) Gli utenti dei servizi digitali dovrebbero comprendere le persone fisiche e giuridiche che sono clienti o abbonati di un mercato online o di un servizio di *cloud computing*, o che visitano il sito web di un motore di ricerca online allo scopo di effettuare ricerche con parole chiave.

⁽¹⁾ GUL 194 del 19.7.2016, pag. 1.

- (10) Nel definire la rilevanza dell'impatto di un incidente, i casi previsti dal presente regolamento dovrebbero essere considerati un elenco non esaustivo di incidenti rilevanti. Occorre trarre insegnamenti dall'attuazione del presente regolamento e dal lavoro del gruppo di cooperazione per quanto riguarda la raccolta di informazioni sulle migliori pratiche in relazione ai rischi e agli incidenti e le discussioni sulle modalità di comunicazione delle notifiche di incidenti di cui all'articolo 11, paragrafo 3, lettere i) e m), della direttiva (UE) 2016/1148. Potrebbero risultarne orientamenti esaustivi sulle soglie quantitative dei parametri di notifica atte a far scattare l'obbligo di notifica per i fornitori di servizi digitali a norma dell'articolo 16, paragrafo 3, della direttiva (UE) 2016/1148. Se del caso, la Commissione può anche vagliare l'opportunità di rivedere le soglie attualmente stabilite nel presente regolamento.
- (11) Al fine di consentire alle autorità competenti di essere informate circa eventuali nuovi rischi, i fornitori di servizi digitali dovrebbero essere incoraggiati a segnalare su base volontaria eventuali incidenti dalle caratteristiche precedentemente sconosciute, ad esempio nuovi exploit, vettori di attacco e autori di minacce, vulnerabilità e pericoli.
- (12) Il presente regolamento dovrebbe applicarsi a partire dal giorno successivo alla scadenza del termine di recepimento della direttiva (UE) 2016/1148.
- (13) Le disposizioni di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato per la sicurezza delle reti e dei sistemi informativi, istituito dall'articolo 22 della direttiva (UE) 2016/1148,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Oggetto

Il presente regolamento specifica ulteriormente gli elementi che i fornitori di servizi digitali devono prendere in considerazione nell'identificazione e nell'adozione delle misure volte a garantire un livello di sicurezza delle reti e dei sistemi informativi che essi utilizzano nel contesto dell'offerta di servizi di cui all'allegato III della direttiva (UE) 2016/1148; esso precisa ulteriormente anche i parametri da prendere in considerazione al fine di determinare se un incidente ha un impatto rilevante sulla fornitura di tali servizi.

Articolo 2

Elementi di sicurezza

1. La sicurezza dei sistemi e degli impianti di cui all'articolo 16, paragrafo 1, lettera a), della direttiva (UE) 2016/1148 è riferita alla sicurezza delle reti e dei sistemi informativi e del loro ambiente fisico e comprende i seguenti elementi:
 - a) la gestione sistematica delle reti e dei sistemi informativi, ossia la mappatura dei sistemi informativi e la definizione di una serie di politiche adeguate in materia di gestione della sicurezza informatica, comprese l'analisi dei rischi, le risorse umane, la sicurezza delle operazioni, l'architettura di sicurezza, la gestione del ciclo di vita dei dati e dei sistemi protetti e, se del caso, la crittografia e la sua gestione;
 - b) la sicurezza fisica e dell'ambiente, ossia la disponibilità di una serie di misure volte a proteggere le reti e i sistemi informativi dei fornitori di servizi digitali dai danni attraverso il ricorso a un approccio globale ai pericoli basato sui rischi, che affronti ad esempio gli errori di sistema, gli errori umani, gli atti dolosi o i fenomeni naturali;
 - c) la sicurezza delle forniture, ossia la definizione e il mantenimento di politiche adeguate al fine di assicurare l'accessibilità e, se del caso, la tracciabilità delle forniture critiche utilizzate nella prestazione dei servizi;
 - d) i controlli dell'accesso alle reti e ai sistemi informativi, ossia la disponibilità di una serie di misure volte ad assicurare che l'accesso fisico e logico alle reti e ai sistemi informativi, ivi inclusa la sicurezza amministrativa di tali reti e sistemi, sia autorizzato e limitato sulla base di esigenze aziendali e di sicurezza.
2. Per quanto riguarda il trattamento degli incidenti di cui all'articolo 16, paragrafo 1, lettera b), della direttiva (UE) 2016/1148, le misure adottate dal fornitore di servizi digitali comprendono:
 - a) il mantenimento e la prova di processi e procedure di individuazione per assicurare l'individuazione tempestiva e idonea degli eventi anomali;
 - b) i processi e le politiche per la segnalazione degli incidenti e l'individuazione delle debolezze e vulnerabilità nei propri sistemi informativi;

- c) una risposta conforme alle procedure stabilite e la comunicazione dei risultati ottenuti con la misura adottata;
- d) la valutazione della gravità dell'incidente, la documentazione delle conoscenze acquisite grazie all'analisi dell'incidente e la raccolta di informazioni pertinenti da utilizzare eventualmente come prova e per sostenere un processo di costante miglioramento.
3. La gestione della continuità operativa di cui all'articolo 16, paragrafo 1, lettera c), della direttiva (UE) 2016/1148 è la capacità di un'organizzazione di mantenere o, se del caso, ripristinare l'erogazione di servizi a livelli predefiniti accettabili in seguito a un incidente perturbatore e comprende:
- a) la definizione e l'uso di piani di emergenza basati sull'analisi dell'impatto sulle attività aziendali volti a garantire la continuità dei servizi erogati dai fornitori di servizi digitali e valutati e testati regolarmente, ad esempio mediante esercitazioni;
- b) la capacità di ripristino di emergenza, valutata e testata regolarmente, ad esempio mediante esercitazioni.
4. Il monitoraggio, l'audit e i test di cui all'articolo 16, paragrafo 1, lettera d), della direttiva (UE) 2016/1148 comprendono la definizione e il mantenimento di politiche relative:
- a) alla conduzione di una sequenza pianificata di osservazioni o misurazioni per valutare se le reti e i sistemi informativi funzionano come previsto;
- b) all'ispezione e alla verifica per controllare se una norma o una serie di orientamenti sono applicati, se le registrazioni sono accurate e se gli obiettivi di efficienza ed efficacia sono raggiunti;
- c) a un processo finalizzato a rivelare i difetti dei meccanismi di sicurezza di una rete o di un sistema informativo che proteggono i dati e mantengono la funzionalità prevista. Tale processo comprende i processi tecnici e il personale coinvolto nel flusso di operazioni.
5. Le norme internazionali di cui all'articolo 16, paragrafo 1, lettera e), della direttiva (UE) 2016/1148 sono le norme adottate da un organismo di normazione internazionale di cui all'articolo 2, paragrafo 1, lettera a), del regolamento (UE) n. 1025/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio ⁽¹⁾. Secondo l'articolo 19 della direttiva (UE) 2016/1148 possono essere utilizzate anche le norme e le specifiche europee o accettate a livello internazionale relative alla sicurezza delle reti e dei sistemi informativi, comprese le norme nazionali esistenti.
6. I fornitori di servizi digitali provvedono a rendere disponibile la documentazione adeguata per consentire all'autorità competente di verificare la conformità con gli elementi di sicurezza di cui ai paragrafi 1, 2, 3, 4 e 5.

Articolo 3

Parametri da prendere in considerazione al fine di determinare se l'impatto di un incidente è rilevante

1. Per quanto riguarda il numero di utenti interessati da un incidente, in particolare gli utenti che dipendono dal servizio per la fornitura dei propri servizi di cui all'articolo 16, paragrafo 4, lettera a), della direttiva (UE) 2016/1148, il fornitore di servizi digitali è in grado di stimare:
- a) il numero di persone fisiche e giuridiche interessate con cui è stato concluso un contratto per la fornitura del servizio, o
- b) il numero di utenti interessati che hanno utilizzato il servizio in particolare in base ai precedenti dati sul traffico.
2. La durata dell'incidente di cui all'articolo 16, paragrafo 4, lettera b), della direttiva (UE) 2016/1148 è il periodo tra la perturbazione della regolare prestazione del servizio in termini di disponibilità, autenticità, integrità o riservatezza e il momento del ripristino.
3. Per quanto riguarda la diffusione geografica relativamente all'area interessata dall'incidente di cui all'articolo 16, paragrafo 4, lettera c), della direttiva (UE) 2016/1148, il fornitore di servizi digitali è in grado di stabilire se l'incidente influisce sulla fornitura dei suoi servizi in determinati Stati membri.
4. La portata della perturbazione del funzionamento del servizio di cui all'articolo 16, paragrafo 4, lettera d), della direttiva (UE) 2016/1148 è misurata per una o più delle seguenti caratteristiche compromesse dall'incidente: disponibilità, autenticità, integrità o riservatezza dei dati o dei servizi correlati.

⁽¹⁾ Regolamento (UE) n. 1025/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 25 ottobre 2012, sulla normazione europea, che modifica le direttive 89/686/CEE e 93/15/CEE del Consiglio nonché le direttive 94/9/CE, 94/25/CE, 95/16/CE, 97/23/CE, 98/34/CE, 2004/22/CE, 2007/23/CE, 2009/23/CE e 2009/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e che abroga la decisione 87/95/CEE del Consiglio e la decisione n. 1673/2006/CE del Parlamento europeo e del Consiglio (GUL 316 del 14.11.2012, pag. 12).

5. Per quanto riguarda la portata dell'impatto sulle attività economiche e sociali di cui all'articolo 16, paragrafo 4, lettera e), della direttiva (UE) 2016/1148, il fornitore di servizi digitali è in grado di dedurre, sulla base di indicazioni quali la natura delle sue relazioni contrattuali con il cliente o, se del caso, il numero potenziale di utenti interessati, se l'incidente ha causato importanti perdite materiali o immateriali per gli utenti, ad esempio in relazione alla salute e alla sicurezza o danni materiali.
6. Ai fini dei paragrafi 1, 2, 3, 4 e 5, i fornitori di servizi digitali non sono tenuti a raccogliere ulteriori informazioni alle quali non hanno accesso.

Articolo 4

Impatto rilevante di un incidente

1. Un incidente è considerato come avente un impatto rilevante se si verifica almeno una delle seguenti situazioni:
- a) il servizio fornito da un fornitore di servizi digitali non è stato disponibile per oltre 5 000 000 di ore utente, dove per ore utente si intende il numero di utenti interessati nell'Unione per una durata di sessanta minuti;
 - b) l'incidente ha provocato una perdita di integrità, autenticità o riservatezza dei dati conservati, trasmessi o trattati o dei relativi servizi offerti o accessibili tramite una rete e un sistema informativo del fornitore di servizi digitali che ha interessato oltre 100 000 utenti nell'Unione;
 - c) l'incidente ha generato un rischio per la sicurezza pubblica, l'incolumità pubblica o in termini di perdite di vite umane;
 - d) l'incidente ha provocato danni materiali superiori a 1 000 000 di EUR per almeno un utente nell'Unione.
2. Sulla base delle buone pratiche raccolte dal gruppo di cooperazione nello svolgimento dei suoi compiti a norma dell'articolo 11, paragrafo 3, della direttiva (UE) 2016/1148 e delle discussioni di cui all'articolo 11, paragrafo 3, lettera m), della medesima direttiva, la Commissione può riesaminare le soglie di cui al paragrafo 1.

Articolo 5

Entrata in vigore

- (1) Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.
- (2) Esso si applica a decorrere dal 10 maggio 2018.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 30 gennaio 2018

Per la Commissione
Il presidente
Jean-Claude JUNCKER

DECISIONI

DECISIONE (UE) 2018/152 DEL CONSIGLIO

del 29 gennaio 2018

relativa alla nomina di un supplente del Comitato delle regioni, conformemente alla proposta della Repubblica federale di Germania

IL CONSIGLIO DELL'UNIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea, in particolare l'articolo 305,

vista la proposta del governo tedesco,

considerando quanto segue:

- (1) Il 26 gennaio 2015, il 5 febbraio 2015 e il 23 giugno 2015 il Consiglio ha adottato le decisioni (UE) 2015/116 ⁽¹⁾, (UE) 2015/190 ⁽²⁾ e (UE) 2015/994 ⁽³⁾, relative alla nomina dei membri e dei supplenti del Comitato delle regioni per il periodo dal 26 gennaio 2015 al 25 gennaio 2020.
- (2) Un seggio di supplente del Comitato delle regioni è divenuto vacante a seguito della scadenza del mandato della sig.ra Anke SPOORENDONK,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

È nominata supplente del Comitato delle regioni per la restante durata del mandato, vale a dire fino al 25 gennaio 2020:

— sig.ra Sabine SÜTTERLIN-WAACK, *Ministerin für Justiz, Europa, Verbraucherschutz und Gleichstellung des Landes Schleswig-Holstein.*

Articolo 2

La presente decisione entra in vigore il giorno dell'adozione.

Fatto a Bruxelles, il 29 gennaio 2018

Per il Consiglio

Il presidente

R. PORODZANOV

⁽¹⁾ Decisione (UE) 2015/116 del Consiglio, del 26 gennaio 2015, relativa alla nomina dei membri titolari e dei membri supplenti del Comitato delle regioni per il periodo dal 26 gennaio 2015 al 25 gennaio 2020 (GU L 20 del 27.1.2015, pag. 42).

⁽²⁾ Decisione (UE) 2015/190 del Consiglio, del 5 febbraio 2015, relativa alla nomina dei membri titolari e dei membri supplenti del Comitato delle regioni per il periodo dal 26 gennaio 2015 al 25 gennaio 2020 (GU L 31 del 7.2.2015, pag. 25).

⁽³⁾ Decisione (UE) 2015/994 del Consiglio, del 23 giugno 2015, relativa alla nomina dei membri titolari e dei membri supplenti del Comitato delle regioni per il periodo dal 26 gennaio 2015 al 25 gennaio 2020 (GU L 159 del 25.6.2015, pag. 70).

RETTIFICHE

Rettifica del regolamento (UE) 2017/1084 della Commissione, del 14 giugno 2017, che modifica il regolamento (UE) n. 651/2014 per quanto riguarda gli aiuti alle infrastrutture portuali e aeroportuali, le soglie di notifica applicabili agli aiuti alla cultura e alla conservazione del patrimonio e agli aiuti alle infrastrutture sportive e alle infrastrutture ricreative multifunzionali, nonché i regimi di aiuti a finalità regionale al funzionamento nelle regioni ultraperiferiche, e modifica il regolamento (UE) n. 702/2014 per quanto riguarda il calcolo dei costi ammissibili

(Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 156 del 20 giugno 2017)

Pagina 10, articolo 1, punto 11 che sostituisce l'articolo 15 del regolamento (UE) n. 651/2014, paragrafo 4, frase introduttiva,

anziché: «Nelle regioni ultraperiferiche i regimi di aiuti al funzionamento compensano i sovraccosti di esercizio ivi sostenuti come conseguenza diretta di uno o più degli svantaggi permanenti di cui all'articolo 349 del trattato, se i beneficiari svolgono la loro attività economica in una regione ultraperiferica e a condizione che l'importo di aiuto annuale per beneficiario nel quadro di tutti i regimi di aiuto al funzionamento attuati ai sensi del presente regolamento non superi alcuna delle seguenti percentuali:»

leggasi: «Nelle regioni ultraperiferiche i regimi di aiuti al funzionamento compensano i sovraccosti di esercizio ivi sostenuti come conseguenza diretta di uno o più degli svantaggi permanenti di cui all'articolo 349 del trattato, se i beneficiari svolgono la loro attività economica in una regione ultraperiferica e a condizione che l'importo di aiuto annuale per beneficiario nel quadro di tutti i regimi di aiuto al funzionamento attuati ai sensi del presente regolamento non superi una delle seguenti percentuali:».

ISSN 1977-0707 (edizione elettronica)
ISSN 1725-258X (edizione cartacea)



Ufficio delle pubblicazioni dell'Unione europea
2985 Lussemburgo
LUSSEMBURGO

IT