

Zuchtmanagement bei Spitzmaulnashörnern (*Diceros bicornis michaeli*) im Zoo Magdeburg

C. Schwarz¹; P. Grothmann²; J. Gottschalk¹; K. Eulenberger³; A. Einspanier¹

¹Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Leipzig; ²Zoologischer Garten Magdeburg gGmbH, Magdeburg; ³Zoo Leipzig, Leipzig

Schlüsselwörter

Gestagene, Östradiol, Regumate® Equine, Zyklus, Gravidität, Nashorn

Zusammenfassung

Gegenstand und Ziel: Das afrikanische Spitzmaulnashorn gehört zu den vom Aussterben bedrohten Tierarten. In Deutschland gibt es fünf Zoos, die diese Tierart halten, jedoch nicht in jedem Zoo wird erfolgreich gezüchtet. So fand im Magdeburger Zoo die letzte Geburt im Dezember 2005 statt. Seitdem konnten keine Deckakte mehr beobachtet werden. Während des Baus einer neuen Nashornanlage, die den Tieren durch die großzügigen Außenanlagen ein weitestgehend natürliches Paarungsverhalten ermöglicht, wurde der Reproduktionsstatus der Kühe untersucht und eine hormonelle Behandlung durchgeführt.

Material und Methoden: Von zwei Spitzmaulnashornkühen (*Diceros bicornis michaeli*; „Mana“, 30 Jahre, und „Maleika“, 17 Jahre) wurden ab 2009 in regelmäßigen Abständen Kotproben gesammelt und die Konzentrationen von Pregnandiolglucuronid (PdG) mittels Enzymimmunoassay und die von Östradiol mit Radioimmunoassay bestimmt. Nach der Auswertung der Hormonprofile wurden beide Tiere am Ende der PdG-dominierten Phase über 12 Tage mit Regumate® Equine, einem synthetischen Progesteron, behandelt. **Ergebnisse:** Die Nashornkuh „Mana“ ließ sich 11 Tage nach dem Absetzen des Medikaments decken und brachte im Dezember 2011 ein gesundes Kalb zur Welt. Bei „Maleika“ fand 13 Tage nach Behandlungsende ein Deckakt statt. Dem schlossen sich in der Folgezeit zwei weitere Kopulationen an. Ihr erstes Kalb wurde im Juli 2012 geboren. **Schlussfolgerung und klinische Relevanz:** Beide Kühe wurden gezielt mit dem synthetischen Progesteron Regumate Equine® behandelt und in der Folge vom Bullen gedeckt. Bei beiden Kühen kam es zeitnah zu einer Trächtigkeit und der Geburt eines Kalbes. Dieses handelsübliche Präparat eignet sich, um den ovariellen Zyklus bei weiblichen Spitzmaulnashörnern zu aktivieren, doch müssen Zeitpunkt der Medikation und Dosierung genau beachtet werden.

Key words

Gestagens, oestradiol, Regumate® Equine, sexual cycle, pregnancy, rhinoceros

Summary

Objective: The African black rhino is an endangered species. In Germany there are only five zoos where this species is kept and breeding has not been successful in all of them. In Magdeburg Zoo the last birth occurred in December 2005, and during the following years, no matings could be observed. During the construction of a new enclosure to enable a more natural mating behaviour, the reproduction status of the rhino cows was evaluated and a hormonal treatment was performed. **Material and methods:** Since 2009, faecal samples from two rhino cows (*Diceros bicornis michaeli*; „Mana“, 30 years old, and „Maleika“, 17 years old) were collected periodically, and the pregnanediol-glucuronide (PdG) and oestradiol concentrations were determined using enzyme immunoassay and radioimmunoassay, respectively. Following evaluation of the results, both cows were treated for 12 days with Regumate® Equine, a synthetic progesterone, during the period of PdG-dominance. **Results:** „Mana“ accepted the bull 11 days after completion of the hormonal treatment, and in December 2011 gave birth to a healthy calf. „Maleika“ had her first ever oestrus 13 days after completion of the medication and also accepted the bull. Thereafter, she had two regular oestrus cycles with normal mating behaviour. Her first calf was born in July 2012. **Conclusion and clinical relevance:** The causal treatment of both cows, following a long period of infertility, with synthetic progesterone led to their pregnancy and the birth of healthy calves. The commercial product Regumate® Equine is appropriate to stimulate the sexual cycle in temporarily infertile black rhinos. Attention should be paid to the timing of the medication and the required dose.

Korrespondenzadresse

Cornelia Schwarz
Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut
der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 1
04103 Leipzig
E-Mail: cornelia2schwarz@googlemail.com

Breeding management of black rhinos (*Diceros bicornis michaeli*) in Magdeburg Zoo

Tierärztl Prax 2014; 42 (G):150–155
Eingegangen: 25. Oktober 2013
Akzeptiert nach Revision: 20. Januar 2014

Einleitung

Die afrikanischen Spitzmaulnashörner gehören zu den vom Aussterben bedrohten Tierarten. Der Bestand in der Wildbahn wird derzeit auf 4880 Exemplare geschätzt (15). Auch die Zahl der in Zoos gehaltenen Tiere ist gering und liegt derzeit bei 287 Individuen (7).

Im Magdeburger Zoo wird seit 1979 das Östliche Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis michaeli*) gehalten. Bis 2005 wurden fünf Jungtiere geboren und aufgezogen. Trotz zweier dem Alter nach potenzieller Zuchtkühe und einem potenten Bullen fanden nach 2005 keine Deckakte mehr statt. Im Jahr 2008 konnte das Zuchtmanagement verändert werden: Einerseits bot ein Neubau den Tieren den nötigen Platz, den sie während des Paarungsrituals benötigen, andererseits ergab sich die Möglichkeit, den endokrinen Status der Kühe zu ermitteln.

Im vorliegenden Artikel wird beschrieben, wie durch Veränderungen des Zuchtmanagements, regelmäßige Kontrolle des endokrinen Status der Tiere und eine gezielte hormonelle Behandlung nach jahrelanger Unfruchtbarkeit Zuchterfolge erreicht werden konnten.

Material und Methoden

Tiere und Haltung

Im Magdeburger Zoo werden vier Spitzmaulnashörner (*Diceros bicornis michaeli*), drei weibliche Tiere und ein Bulle, gehalten. Die Nashornkuh „Kenia“ ist mit ca. 45 Jahren das älteste in einem Zoo lebende Spitzmaulnashorn und wurde aufgrund ihres Alters nicht in die Zuchtbemühungen eingeschlossen. Die beiden anderen Tiere waren zum Zeitpunkt der Behandlung 29 („Mana“) bzw. 15 („Maleika“) Jahre alt. Alle Lebensdaten dieser beiden Kühe sowie des Bullen „Madiba“ sind in ► Tab. 1 dargestellt.

Die alte Anlage besaß drei kleinere Außenanlagen, die den Tieren während des Paarungsrituals, das geprägt ist vom Treiben der Kuh durch den Bullen und Scheinangriffe ihrerseits, keine Möglichkeiten bot, schweren Auseinandersetzungen aus dem Weg zu gehen. Die neue, im Jahr 2010 bezogene Anlage „Africambo1“ ermöglicht den Nashörnern, dieses physiologische Verhaltensmuster auf weitläufigen und gut strukturierten Anlagen besser auszuüben.

Probenentnahme und Laboruntersuchungen

Um Informationen zum hormonellen Status der Nashornkühe zu erhalten, kam eine nichtinvasive, stressfreie und in der Zoo- und Wildtierforschung etablierte Methode der Hormonuntersuchung im Kot zur Anwendung (11). Ab Januar 2009 wurden von beiden Kühen drei Kotproben pro Woche gesammelt, sofort bei -20°C tiefgefroren und ohne Unterbrechung der Gefrierkette ins Veterinär-Physiologisch-Chemische Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig zur Untersuchung verbracht.

Tab. 1 Demographische Informationen zu den Spitzmaulnashörnern im Zoo Magdeburg

Table 1 Demographic data for the black rhinoceroses in Magdeburg Zoo.

Tier	Geburtsdatum/Ort	Vater	Mutter
Mana ♀	15.09.1981/Magdeburg	Kibo	Kenia
Maleika ♀	23.12.1995/Magdeburg	Eli	Mana
Madiba ♂	1992/Wildfang	wild	wild

Die Proben wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und jeweils 0,5 g mit 0,7 ml H_2O bidest. versetzt. Für die Extraktion gemäß einer modifizierten Methode nach Möstl (8) wurden die Proben mit 4,8 ml Methanol 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend die Extrakte bei 3000 U/min für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert.

Für die Zyklusanalyse wurden Östradiol und Pregnanolglucuronid, beim Spitzmaulnashorn der Hauptmetabolit von Progesteron, untersucht. Das Hormon Progesteron wird größtenteils in der Leber glukuronidiert und als Pregnanol-3-glucuronid (PdG) im Kot ausgeschieden (13). Für die Untersuchungen stand ein laboreigener PdG-Enzymimmunoassay zur Verfügung: als Antikörper Anti-PdG-BSA (FKA-334E, Cosmo Bio Co., Japan), als Enzym PdG-HRP (FKA-333, Cosmo Bio Co., Japan) sowie PdG als Referenzsubstanz (P-3635, Sigma). Der Messbereich der Eichkurve erstreckte sich von 1,0 bis 50 ng/ml bei einer Sensitivität von 6 ng/g. Die Intra- und Interassaykoeffizienten betragen für PdG 5,2% bzw. 10,5%.

Die Bestimmung von Östradiol erfolgte mit einem nach Gottschalk (4) modifizierten Radioimmunoassay (RIA) mit ^3H -markiertem Östradiol (PerkinElmer, Finnland) und [2,4,6,7]-Anti-Östradiol-17 β -Carboxymethyloxim-BSA (Jenapharm®, Jena). Der Messbereich lag zwischen 37 und 1200 pg/ml, die Sensitivität bei 0,17 ng/g. Die Intra- und Interassaykoeffizienten betragen 4,5% bzw. 8,8%.

Medikation

Für die hormonelle Behandlung der Kühe wurde Regumate® Equine (Intervet, Wien) eingesetzt. Bei dem enthaltenen Wirkstoff Altrenogest handelt es sich um ein oral wirksames Gestagen, das die Konzentration von LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) im Blut senkt. Es kommt zur Rückbildung aller großen Follikel ($> 20\text{--}25\text{ mm}$) und die Ovulation wird verhindert. Während der zweiten Hälfte der Behandlung (nach ca. 5 Tagen) nimmt die FSH-Konzentration zu und löst eine Follikelwachstumswelle aus. Nach Ende der 10-tägigen Regumate®-Behandlung steigt die LH-Konzentration wiederum stetig an, wodurch um den 11. bis 14. Tag die Ovulation ausgelöst wird (6).

Bei der Umsetzung in das neue Gehege am 01.06.2010 konnten beide Kühe gewogen werden, wodurch eine exakte Dosis-

bestimmung möglich war. Die Dosis von 25 ml pro Tier und Tag (~0,055 mg Altrenogest pro Kilogramm Körpermasse) wurde über einen Zeitraum von 12 Tagen in einem geförmten, portionierten Haferbreigemisch direkt aus der Hand oral verabreicht. Im Gegensatz dazu ist die Dosierung beim Pferd niedriger und die Applikationsdauer kürzer (6).

Die Medikation von „Mana“ begann direkt nach der Ankunft des Bullen im neuen Nashornhaus. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Kuh in der folliculären Phase auf niedrigem PdG-Level. „Maleika“ wurde zu diesem Zeitpunkt aufgrund eines frisch operativ abgesetzten Horns noch nicht mit dem Bullen zusammengeführt, sondern erst 3 Monate später. Zu diesem Zeitpunkt befand sie sich ebenfalls in der Phase eines niedrigen PdG-Levels.

Ergebnisse

Beide Nashornkühe zeigten vor der hormonellen Stimulation sehr unregelmäßige Zyklen. So bestanden bei „Mana“ relativ niedrige Östradiolkonzentrationen (Mittelwert 10 ng/g Kot) mit undeutlichen Anstiegen und auch die Verläufe der PdG-Konzentration

entsprachen nicht einem physiologischen Zyklus. Betrachtet man den Verlauf des PdG-Spiegels im Jahr 2009, scheint es nur einen ovariellen Zyklus mit einem deutlichen Anstieg (Pfeil) gegeben zu haben (▶ Abb. 1).

Die endokrinen Analysen bei „Maleika“ fielen ähnlich aus: ein niedriges Östradiolniveau über einen 3-monatigen Zeitraum (Mittelwert 12 ng/g Kot) mit nur einem Anstieg. Die PdG-Werte sind insgesamt niedrig (Mittelwert 212 ng/g Kot) und lassen kein Zyklusgeschehen erkennen (▶ Abb. 2).

Die Umsetzung in die neue Anlage erfolgte am 01.06.2010. Zuvor verhielten sich die Hormonprofile wie folgt: Bei „Mana“ kam es letztmalig am 30.03.2009 zu einem deutlichen Anstieg der Östradiolkonzentration, doch fehlte ein sich anschließender deutlicher Anstieg der PdG-Konzentration. Im Mai und im Juni 2010 ergaben die Östradiol- und PdG-Bestimmungen keine Hinweise auf eine zyklische Ovaraktivität (▶ Abb. 3).

Von Anfang März bis Ende Juli 2010 zeigte der Kurvenverlauf bei „Maleika“ niedrige PdG-Werte und eine ansteigende und über 2 Monate anhaltende Erhöhung der Östradiolkonzentration auf ca. 400 ng/g Kot. Auch bei diesem Tier änderte sich die endokrine Situation nach der Umsetzung nicht grundlegend (▶ Abb. 4).

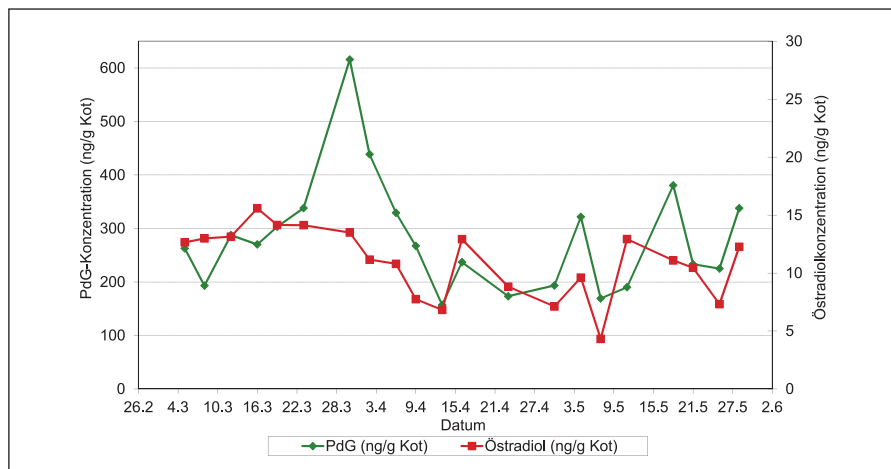


Abb. 1

Hormonprofile aus dem Jahr 2009 von Pregnanediolglucuronid (PdG, grün) und Östradiol (rot) der Nashornkuh „Mana“ vor der Umsetzung ins neue Gehege 2010

Fig. 1

Hormonal profiles from 2009 of pregnanediolglucuronide PdG (green) and oestradiol (red) from rhino cow „Mana“ before moving into the new enclosure in 2010.

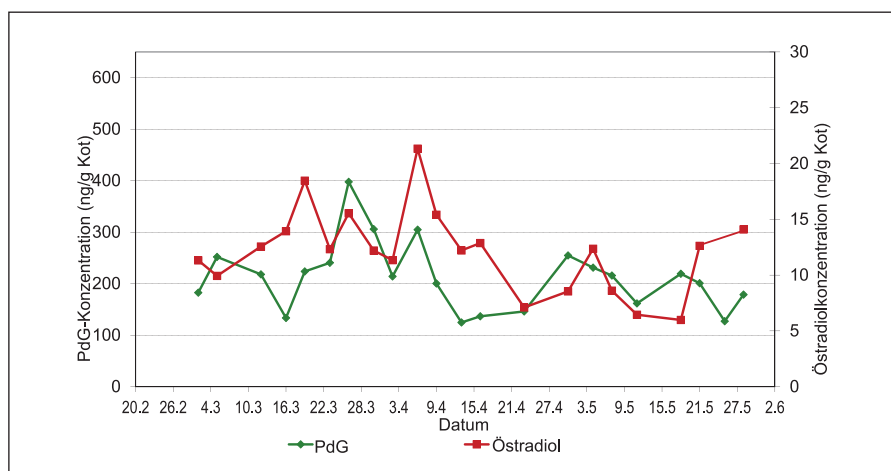


Abb. 2

Hormonprofile aus dem Jahr 2009 von PdG (grün) und Östradiol (rot) der Nashornkuh „Maleika“ vor der Umsetzung ins neue Gehege 2010

Fig. 2

Hormonal profiles from 2009 of PdG (green) and oestradiol (red) from rhino cow „Maleika“ before moving into the new enclosure in 2010.

Abb. 3

Hormonprofile von „Mana“ vor und nach der Umsetzung 2010

Fig. 3

Hormonal profiles of „Mana“ before and after moving into the new enclosure in 2010.

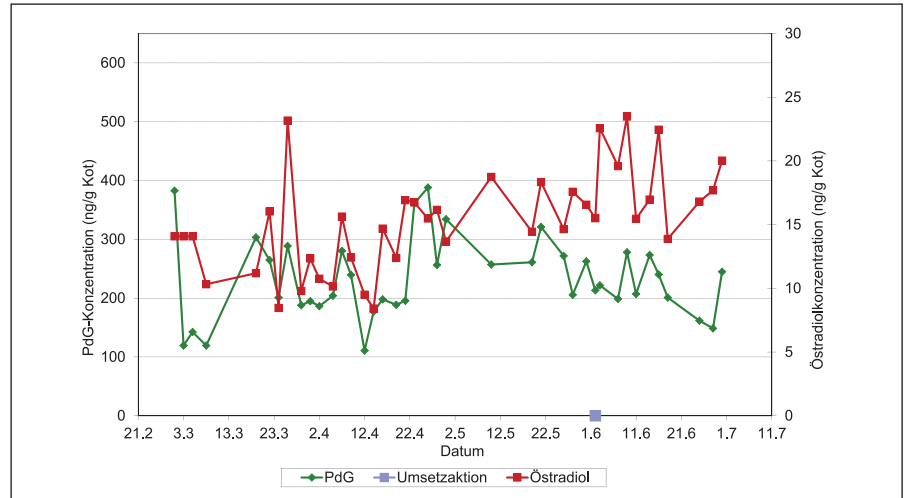
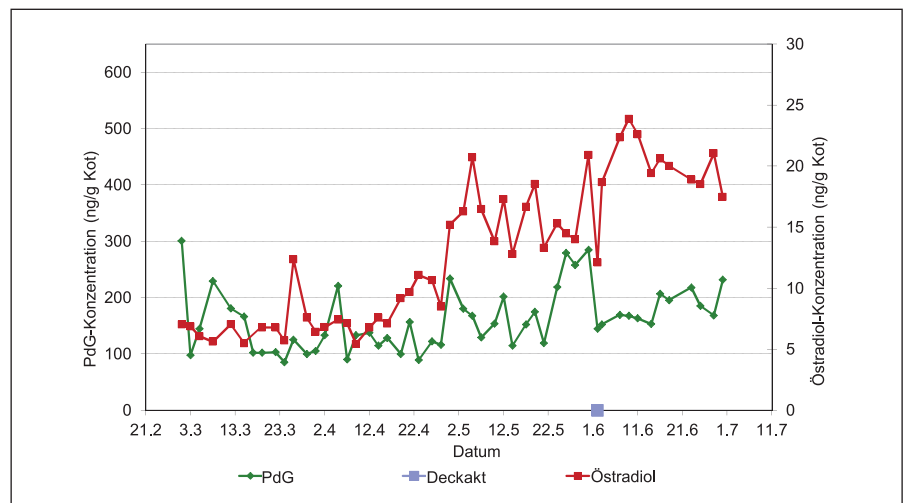


Abb. 4

Hormonprofile von „Maleika“ vor und nach der Umsetzung 2010

Fig. 4

Hormonal profiles of „Maleika“ before and after moving into the new enclosure in 2010.



Beide Kühe wiesen vor der Behandlung mit Regumate® Equine nicht nur unregelmäßige Zyklusaktivitäten auf, sondern es zeigte auch der Bulle kein sexuelles Interesse an den Kühen.

Elf Tage nach Absetzen von Regumate® Equine und einen Tag nach einer Kopulation wurde bei „Mana“ ein Anstieg der Östradiolkonzentration im Kot gemessen. Unter Berücksichtigung der verzögerten Ausscheidung der Steroidhormone im Kot von ca. 1–2 Tagen ist der Tag des Deckaktes als wahrscheinlicher Ovulationszeitpunkt zu werten (14). In den folgenden Monaten zeigte der Bulle kein Interesse mehr an „Mana“. Während der Östradiolspiegel nicht weiter anstieg, erhöhte sich die PdG-Konzentration stetig (▶ Abb. 5). Am 24.12.2011 brachte „Mana“ ein gesundes weibliches Kalb zur Welt.

„Maleika“ wurde vom 19. bis 30.01.2011 mit Regumate® Equine behandelt. Dreizehn Tage nach Ende der Behandlung stellte sich bei ihr die erste Brunst ein und sie ließ sich auch decken. In zwei weiteren Zyklen mit Anstieg der Östradiolkonzentration wurden

jeweils auch Deckakte beobachtet. Ab Juli 2011 ließen sich steigende PdG-Konzentrationen ermitteln (Abb. 6). Ihr erstes Kalb gebar „Maleika“ am 16.07.2012.

Bei beiden Kühen erfolgte mit den kommerziellen, für Equiden konzipierten Testkits Wee-Foal 38 und Wee-Foal 110 (alphamed®, St. Ingbert) am 104. und 307. Trächtigkeitstag eine Untersuchung zur Graviditätsfeststellung. Beide Testsysteme, die Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) messen, lieferten bei beiden Tieren negative Ergebnisse.

Diskussion

Seit 2005 gab es im Zoo Magdeburg keinen Nachwuchs an Spitzmaulnashörnern mehr. Dies war Anlass für eine genauere Beurteilung des hormonellen Status beider Zuchtkühe durch Bestimmung der Pregnandiolglucuronid (PdG)- und Östradiolkonzentra-

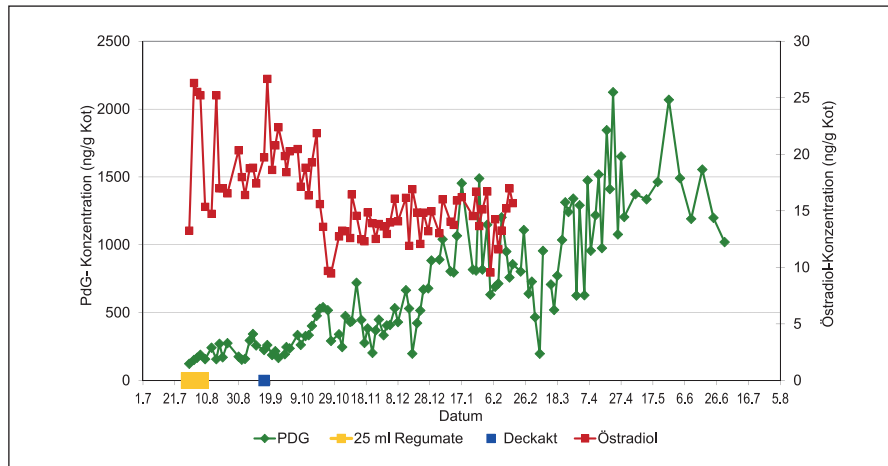


Abb. 5

Hormonprofile von „Mana“ während und nach der Behandlung mit Regumate® Equine 2010

Fig. 5

Hormonal profiles of „Mana“ during and after treatment with Regumate® Equine in 2010.

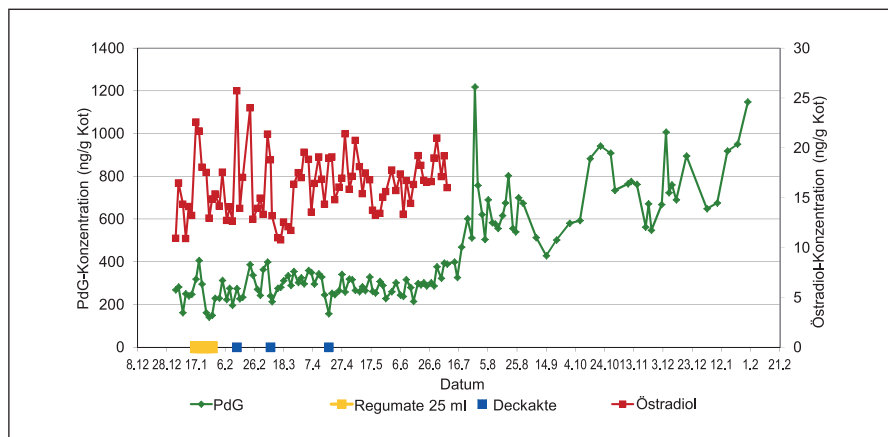


Abb. 6

Hormonprofile von „Maleika“ während und nach der Behandlung mit Regumate® Equine 2011

Fig. 6

Hormonal profiles of „Maleika“ during and after treatment with Regumate® Equine in 2011.

tion im Kot über einen längeren Zeitraum. Nach Auswertung der Resultate musste festgestellt werden, dass beide Kühe kein physiologisches Zyklusgeschehen aufwiesen. Sowohl vor als auch nach der Umsetzung in das neue Gehege bestanden unregelmäßige Ovarzyklen, die in niedrigen PdG- und Östradiolwerten Bestätigung fanden. Die durchschnittlichen PdG-Werte der beiden Tiere lagen bei 260 bzw. 290 ng/g Kot. In der Literatur werden für in-gravide Tiere Werte um 800 ng/g Kot beschrieben (3). Nach Schwarzenberger et al. (14) sind in der folliculären Phase Werte um 1000 ng/g und in der lutealen Phase Werte über 1500 ng/g zu erwarten.

Nach der Umsetzung in die neue Nashornanlage wurde bei beiden Kühen deshalb eine Hormontherapie mit dem synthetischen Gestagenpräparat (Regumate® Equine) begonnen. Sehr wahrscheinlich wirkten sich einerseits die verbesserten Haltungsbedingungen positiv auf das Fortpflanzungsverhalten und die neuroendokrinen Regulationsmechanismen aus. Andererseits ist der hormonellen Behandlung mit Regumate Equine® entscheidende Bedeutung für das Einsetzen eines regelmäßigen und letztlich fertilen Zyklus bei beiden Kühe beizumessen.

Anzunehmen ist, dass bei Nashornkühen ähnlich wie bei Stuten aufgrund einer hohen FSH- und niedrigen LH-Produktion

irreguläre Zyklen entstehen können. In solchen Fällen reicht die LH-Konzentration nicht aus, um eine Ovulation auszulösen (1). Auch bei Hauspferden werden Gestagene unter anderem zur Zyklusinduktion eingesetzt. Durch den Gestageneinfluss kommt es zu einem negativen Feedback auf die GnRH-Freisetzung und infolgedessen zu einer verminderten LH- und FSH-Sekretion. Nach einigen Tagen steigt die FSH-Sekretion an und es folgt eine Follikelwelle. Nach Absetzen des Gestagens wird vermehrt LH sezerniert und der präovulatorische Follikel wächst und kann ovulieren (1). Nach Radcliffe et al. (10) sind die Spitzmaulnashörner großer Rassen sehr ähnlich und bilden ebenso wie sie präovulatorische Follikel von einem Durchmesser bis 50 mm an. Aurich (1) betont die Bedeutung des richtigen Zeitpunkts für die hormonelle Manipulation bei der Stute, da sie, anders als die Kuh, nur eine Follikelwachstumswelle hat (1). Nach eigenen Erfahrungen ist der Erfolg mit Regumate® Equine bei der Nashornkuh in der folliculären Phase am erfolgreichsten (11). Entscheidend sind die Dosierung, der Zeitpunkt der Verabreichung und die Applikationsdauer. Regumate® wurde schon in der Vergangenheit beim Spitzmaulnashorn eingesetzt, doch meist ohne genaue Kenntnis und des endokrinen Status und des Gewichts der Tiere und deshalb in zu niedrigen Dosen.

Fazit für die Praxis

Regumate® Equine erwies sich als geeignet, um bei Spitzmaulnashornkühen einen fertilen Zyklus zu induzieren. Im Ergebnis der beschriebenen Behandlungen wurden beide Kühe gravid und brachten ein Kalb zur Welt. Die lange Tradition der Magdeburger Nashornzucht hat somit ihren Fortgang gefunden.

Ein Fortpflanzungserfolg lässt sich beim Breitmaulnashorn in Menschenobhut bekanntermaßen noch schwieriger erzielen. Eine erfolgreiche Therapie, bei der sich durch ausschließliche Gabe von Regumate® ein Zuchterfolg einstellt, ist beim Breitmaulnashorn nicht beschrieben (8).

Die beiden kommerziellen Testkits Wee-Foal 38 und Wee-Foal 110 (alphamed®, St. Ingbert) sind für eine Trächtigkeitsanalyse beim Spitzmaulnashorn nicht geeignet.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Danksagung

Wir bedanken uns bei den Tierpflegern des Nashornhauses im Zoo Magdeburg.

Literatur

1. Aurich C. Manipulation des Sexualzyklus bei der Stute. In: Reproduktionsmedizin beim Pferd, 2. Aufl. Aurich C, Hrsg. Stuttgart: Parey 2009; 53–70.
2. Berkeley EV, Kirkpatrick JF, Schaffer NE, Bryant WM, Threfall WR. Serum and Faecal Steroid Analysis of Ovulation, Pregnancy and Parturition in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*). Zoo Biology 1997; 16: 121–132.
3. Garnier JN, Green DI, Pickard AR, Shaw HJ, Holt WV. Non-invasive diagnosis of pregnancy in wild black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) by faecal steroid analysis. Reprod Fert Dev 1998; 10: 451–458.
4. Gottschalk J. Validierte Methode zur Bestimmung von Progesteron und Östradiol. Labormitteilungen an das Institut für Tierarzneimittel Berlin GmbH; 1999.
5. Hermes R, Göritz F, Streich WJ, Hildebrandt TB. Assisted Reproduction in Female Rhinoceros and Elephants – Current Status and Future Perspective. Reprod Dom Anim 2007; 40: 33–44.
6. Intervet International GmbH. Regumate® Equine ad us. Vet., Lösung zum Eingeben. Clini ClinPharm CliniTox http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?tak/05000000/00057595.01?inhalt_c.htm (Februar 2006).
7. Frese R. Internationales Zuchtbuch für das Spitzmaulnashorn, 11. Ausg. Berlin: Zoologischer Garten Berlin 2009.
8. Möstl E, ed. Measuring steroids in faeces of mammals to monitor the reproductive status: success and disappointment. 1st International Symposium Faecal Steroid Monitoring Zoo Animals, Rotterdam, Netherlands 1992; 5.
9. Patton L, Czekala N, Schaffer N, Lance V. Hormonal Manipulation of Rhinoceros. Proceedings of a workshop on problems associated with the low rate of reproduction among captive-born female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). Zoological Society 1988; 1: 1–55.
10. Radcliffe RW, Eyres AI, Patton ML, Czekala NM, Emslie RH. Ultrasonographic characterization of ovarian events and fetal gestational parameters in two southern black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) and correlation to faecal progesterone. Theriogenology 2001; 55: 1033–1049.
11. Schwarz C, Gottschalk J, Lochmann G, Tätzner S, Langguth S, Eulenberger K, Bernhard A, Einspanier A. Effect of the synthetic applied Progestin Altrenogest on black rhinoceroses. Poster on the International Conference on Disease of Zoo und Wild Animals; 2010 May 12–15; Madrid, Spain.
12. Schwarzenberger F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. Int Zoo Yb 2007; 41: 52–74.
13. Schwarzenberger F, Tomášová K, Holečková D, Matern B, Möstl E. Measurement of fecal steroids in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme immunoassays for 20-oxo-pregnanes. Zoo Biology 1996; 15: 159–171 .
14. Schwarzenberger F, Francke R, Göldenboth R. Concentration of faecal progestagen metabolites during the oestrus cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). J Reprod Fert 1993; 98: 285–291.
15. Emslie R. *Diceros bicornis ssp. michaeli*. IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. (10 October 2013).